
ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

TRAITEMENT DES TRYPANOSOMIASES

PAR LES

" COULEURS DE BENZIDINE "

SECONDE PARTIE — ÉTUDE EXPÉRIMENTALE

PAR MM. F. MESNIL ET M. NICOLLE

Chefs de laboratoire à l'Institut Pasteur.

Un des problèmes qui intéressent le plus l'expansion coloniale, et de la façon la plus urgente, c'est la lutte contre les trypanosomiasés. La presque totalité des trypanosomes passant par un hôte invertébré, l'idéal consisterait évidemment à détruire celui-ci. On sait quelles difficultés présente déjà le problème quand il s'agit des Culicides, accessibles cependant durant la phase larvaire; pour les Glossines et les Tabanides, ce que l'on connaît des conditions de leur reproduction ne laisse guère espérer une réussite durant cette phase. Quant aux adultes, comment les éliminer? Certaines tsétsés s'éliminent, il est vrai, d'elles-mêmes en disparaissant avec le gros gibier africain, mais il n'est nullement démontré que pareille chose ait lieu dans le cas de la *Glossina palpalis*, qui transmet le trypanosome humain. Reste donc la protection de l'homme et des animaux sensibles contre les piqûres des Insectes dangereux; on sent tout ce qu'une telle prophylaxie offre d'ardu.

On a cherché, cela va sans dire, à rendre les animaux réfractaires, en les vaccinant, mais rien ne prouve l'efficacité du procédé de Koch-Schilling (pour les Bovidés); il reste tout au moins incertain et Koch l'a d'ailleurs abandonné.

Quant à la mesure radicale, par excellence, l'abatage global des sujets infectés, elle n'est de mise que dans les régions bien limitées, les îles notamment. Appliqué d'une façon précoce et sévère, on peut affirmer qu'il eût enrayé l'épidémie de Maurice, car il a pleinement réussi à Java.

La sérothérapie n'ayant conduit, jusqu'ici, à aucun résultat pratique, on a dû s'adresser, en fin de compte, aux composés chimiques. Les observations anciennes, concernant les propriétés médicamenteuses des arsenicaux, ont sûrement contribué à cette nouvelle orientation de la lutte contre les trypanosomes.

Supposons, pour le moment, le problème résolu, grâce à la médication chimique; il convient de nous demander (ainsi que Laveran l'a fait justement remarquer) s'il est possible d'escompter comme corollaire la disparition des trypanosomiasés. Dans une certaine mesure seulement, puisque nous savons que les sujets guéris ne possèdent pas l'immunité. C'est là une circonstance très défavorable en ce qui concerne le Nagana, dont l'agent de transmission paraît exister toute l'année; mais l'inconvénient s'atténue beaucoup si nous envisageons les maladies convoyées par les Tabanides, lesquels ne se rencontrent que durant une saison, parfois durant quelques semaines simplement (études des Sargent sur la trypanosomiasé des dromadaires d'Algérie). On a donc alors tout le temps nécessaire pour détruire les parasites dans le corps des mammifères infectés. Ce faisant, on réalise non seulement la thérapeutique de l'individu atteint, mais encore la prophylaxie de toute la collectivité puisque l'on supprime, pendant une période plus ou moins longue, voire indéfinie, les parasites du sang circulant. Même pour ce qui regarde les trypanosomiasés à tsétsés, on a le droit de prévoir, à la suite de l'emploi des moyens chimiques, un abaissement progressif de la morbidité, car ce traitement permettra de tarir de plus en plus le « réservoir de virus » actuellement existant.

Ajoutons, en terminant, que la majorité des médicaments efficaces manifestent un pouvoir préventif très net; celui-ci sera utilisé avec fruit quand il s'agira de faire traverser aux animaux une zone à tsétsés, ou de les rendre réfractaires lors de la saison des taons.

La thérapeutique chimique nous paraît donc appelée, tout

mis en balance, à rendre d'incontestables services dans la lutte contre les trypanosomiasés.

TRAITEMENT DES TRYPANOSOMIASES EN GÉNÉRAL (HISTORIQUE)¹

Comment s'est développée cette thérapeutique chimique? Lingard, puis Bruce, ont bien montré, les premiers, l'avantage que l'on pouvait retirer du traitement arsenical, chez les Équidés atteints de Surra et de Nagana; ils ont même noté quelques guérisons. Laveran et Mesnil ont abordé, ensuite, l'étude des arsenicaux, appliqués à la thérapeutique du Nagana expérimental; ils ont constaté qu'en répétant les injections, on parvenait à prolonger notablement la vie des chiens et des rats infectés, mais ils n'ont pu sauver les animaux. Par contre (fait très intéressant au point de vue théorique), ils ont réussi, avec le sérum humain, à guérir quelques souris naganées; Laveran a obtenu des résultats analogues chez les souris cadérées ou infectées de Surra.

Ehrlich et Shiga, en découvrant le Trypanroth, ont fait faire un grand pas au traitement des trypanosomiasés. Ce médicament coloré leur a permis de sauver une notable proportion de souris cadérées, résultat vérifié depuis par Laveran et Mesnil, Halberstädter, Franke, Thomas. Malheureusement, comme le laissait prévoir le travail d'Ehrlich et Shiga, le Trypanroth se montre bien moins efficace vis-à-vis des autres animaux infectés de Mal de caderas et aussi vis-à-vis des autres trypanosomiasés. Tout le monde s'accorde en effet aujourd'hui pour affirmer qu'il ne saurait guérir les souris naganées (Ehrlich et Shiga, Halberstädter, Franke, Thomas). Il échoue, également, chez les souris inoculées avec le Surra de l'île Maurice, sauf quand on réitère le traitement (Laveran); il échoue toujours chez les rats ou autres animaux qui ont reçu le *Trypanosoma gambiense* (Laveran, Thomas). Par contre, il peut sauver les souris infectées de Mbori (Laveran, Franke) ou de Dourine (Halberstädter).

1. Le lecteur trouvera des détails plus circonstanciés dans LAVERAN et MESNIL, *Trypanosomes et Trypanosomiasés* et dans les analyses publiées par l'un de nous in *Bulletin de l'Institut Pasteur*, t. I-IV, *passim*.

Les verts de méthyle ou d'éthyle, préconisés par Wendelstadt et M^{lle} Fellmer, n'ont jamais guéri un seul animal, quand on les a employés seuls; ils n'ont pu déterminer que des survies assez longues chez les rats naganés.

Un progrès important est dû à Thomas qui a introduit, dans la thérapeutique des trypanosomiasés, l'atoxyl, dérivé arsenical remarquable par sa faible toxicité. En réitérant l'administration de ce médicament, il paraît avoir sauvé une certaine proportion d'animaux atteints de diverses maladies à trypanosomes. Des considérations théoriques nous avaient amenés, de notre côté, à entreprendre des recherches avec l'atoxyl, avant la publication du travail de Thomas.

Mentionnons, pour mémoire, les expériences de Balfour et Neave; ces auteurs ont employé la chrysoïdine, qui semble ne leur avoir donné que de mauvais résultats.

L'impossibilité d'obtenir à coup sûr des guérisons, par l'emploi exclusif de l'un quelconque des médicaments que nous venons de passer en revue devait forcément conduire à tenter l'association de deux ou plusieurs des dérivés efficaces. C'est ce que qu'a fait Laveran, peu après la découverte du Trypanroth, en injectant cette couleur le lendemain d'un traitement arsenical et en renouvelant, plus ou moins fréquemment, l'administration des deux composés actifs. Il a pu guérir ainsi : des rats, des souris et des chiens, infectés de Mbori et de Surra de l'île Maurice; des rats, des chiens et deux macaques (*M. rhesus*) inoculés avec le *Trypanosoma gambiense*; et deux chiens atteints de Dourine expérimentale.

Grâce à une semblable association médicamenteuse, Franke a sauvé des lapins et un cercopithèque, infectés de Mal de caderas. Thomas est favorable, lui aussi, à l'emploi combiné de l'acide arsénieux et du Trypanroth; toutefois, ayant reconnu la supériorité de l'atoxyl sur le premier de ces dérivés, il donne, dans ses recherches, la préférence au couple « atoxyl-Trypanroth ». Malheureusement, son travail contient trop peu de détails sur les résultats obtenus; il se plaint de la toxicité du Trypanroth, et dans sa note préliminaire, il émet le désir que celui-ci puisse être bientôt remplacé par une couleur « moins irritante ». Laveran avait déjà exprimé un vœu analogue.

Wendelstadt et M^{lle} Fellmer ont cherché à perfectionner leur procédé de traitement, en faisant suivre l'administration du vert brillant de celle de l'acide arsénieux. De cette façon, un rat (au moins) et un *Macacus rhesus* ont été guéris. Le singe s'est même montré fortement immun, contrairement à la règle générale concernant les sujets guéris à la suite d'un traitement.

En regard de ces résultats positifs concordants, signalons, pour être complets, les résultats négatifs du traitement arsenic-Trypanroth, pour les singes (Brumpt et Wurtz) et les rats (de Magalhaes) infectés avec le *Trypanosoma gambiense*.

Nos recherches, commencées il y a deux ans (par conséquent avant l'introduction de l'atoxyl dans la thérapeutique des trypanosomiasés), ont eu pour but non seulement d'étudier les facteurs chimiques qui président à l'activité des « couleurs de benzidine », mais encore de trouver, si possible, des agents médicamenteux supérieurs au Trypanroth, vis-à-vis des diverses affections à trypanosomes.

Dans la partie chimique de notre travail, nous n'avons fait, à la partie expérimentale, que les emprunts strictement indispensables. Ceux-ci ont surtout consisté en simples chiffres, exprimant l'efficacité maxima manifestée, à l'endroit de quatre trypanosomiasés, par un grand nombre de couleurs que nous avaient gracieusement fournies diverses Maisons de Matières colorantes et notamment les *Farbenfabriken* d'Elberfeld. Dans les lignes qui vont suivre, il ne sera plus question que des « bonnes couleurs », mais, par contre, l'histoire de leur pouvoir curatif, vis-à-vis des agents de *trois trypanosomiasés animales* — Nagana, Mal de caderas et Surra — sera l'objet d'une étude approfondie.

Nous tenons à faire remarquer, dès maintenant, qu'au cours de nos recherches sur les 3 trypanosomiasés qui viennent d'être mentionnées, nous avons toujours administré *exclusivement* tel ou tel de nos médicaments colorés. Dans un travail ultérieur, consacré à la trypanosomiasé humaine, la question de l'association des couleurs, soit entre elles, soit avec d'autres composés chimiques, sera envisagée en détail.

TRAITEMENT DU NAGANA EXPÉRIMENTAL DES SOURIS

Nous étudierons, tout d'abord, le traitement par les « couleurs de benzidine », puis nous relaterons, à titre comparatif, un certain nombre de recherches, entreprises avec les dérivés arsenicaux.

TRAITEMENT PAR LES « COULEURS DE BENZIDINE »

Avant de mentionner les résultats fournis par la chromothérapie du Nagana, nous croyons utile de présenter certaines *observations d'ordre pratique*, susceptibles d'intéresser ceux qui voudraient reprendre nos expériences. Les quelques difficultés expérimentales dont nous allons parler ne doivent point être ignorées des chercheurs, mais il ne faudrait pas, d'un autre côté, s'en exagérer l'importance.

En premier lieu, nous conseillons d'éviter l'emploi des animaux trop petits, dont la sensibilité, à l'égard des médicaments colorés, peut être très marquée. On fera bien, suivant nous, de rejeter les sujets pesant moins de 15 à 16 grammes et même, pour plus de précaution, ceux qui n'atteindront point 17 à 18 grammes, surtout si leur aspect général laisse tant soit peu à désirer. Il faut savoir également que *certaines souris naganées*, convenablement choisies cependant avant l'injection, *supportent mal l'administration des couleurs*; elles peuvent succomber rapidement, sans qu'il existe aucun rapport visible entre les phénomènes toxiques observés et la quantité de parasites présents dans le sang au moment de l'intervention. L'intoxication se traduit tantôt par des accidents propres (anorexie, immobilité, poil piqué, yeux « collés », hypothermie), tantôt par le *réveil d'un parasitisme latent*, le plus souvent intestinal (bactéries, coccidies, ténias). Il faut, enfin, être prévenu que *quelques animaux guéris meurent cachectiques* à la longue, ce qui peut tenir à une intoxication lente par la couleur (intoxication semblant porter principalement sur le rein), à l'action lente d'un parasitisme « réveillé », peut-être aussi à une intoxication lente d'origine trypanosomique (combien de fois ne voyons-nous pas l'organisme périr empoisonné, longtemps après la disparition de tel ou tel microbe pathogène?).

Voici maintenant, rapportées sous la forme d'un tableau d'ensemble, les caractéristiques principales des 6 « bonnes couleurs » dont nous allons comparer l'activité thérapeutique. La solubilité de ces couleurs n'est pas très grande (un peu moins de 2 0/0); aussi ont-elles été uniquement employées à l'état de solution au centième dans l'eau *distillée*. L'eau physiologique doit être absolument rejetée ici, à cause de la facile précipitabilité de cette famille de dérivés par le sel marin. Ajoutons que l'unique mode d'administration de nos médicaments a été la voie hypodermique.

COMPOSITION CHIMIQUE	SYMBOLE conventionnel.	COULEUR des solutions.	DOSE THÉRAPEUTIQUE optima pour une souris de 15-20 gr.
o. Dichlorobenzidine + acide H.	Cl	Bleu violet.	1 cgr.
o. Tolidine + ac. H (alc.-alc.).	A	Bleu.	1 cgr.
o. Tolidine + ac. H (alc.-alc.).	A'	Bleu.	1 cgr.
Benzidine + naphtylène-diamine disulfo 2.7.3.6.	α	Rouge cerise foncé.	0 ^{esr} ,75
o. Sulfobenzidine + ac. R (Trypanroth).	T	Rouge cerise.	0 ^{esr} ,50
p. Diamidodiphénylurée + ac. H.	Ph	Violet.	1 cgr.

Ceci posé, nous diviserons le traitement du Nagana en *préventif* et *curatif*.

TRAITEMENT PRÉVENTIF

Nous entendons, sous ce nom, *toute intervention précédant l'apparition des parasites* dans le sang. On fait donc de la médecine préventive non seulement quand on injecte les couleurs 24 heures avant les trypanosomes, mais encore quand on les administre soit en même temps que ceux-ci (et à distance, bien entendu), soit 24 heures — et parfois jusqu'à 48 et 72 heures — après.

Nos expériences ont été entreprises, parallèlement, avec les couleurs A et Cl. Cl était administré à la dose thérapeutique optima A, à une dose un peu inférieure ; ce qui explique, en partie, les médiocres résultats observés avec A. La supériorité de Cl sur ce dernier ne saurait cependant faire de doute, puisque les survies ont toujours été plus longues et que, dans un cas même, l'animal n'a point contracté le Nagana. Le faible nombre de nos recherches — que résume le tableau ci-joint — ne permet pas une analyse utile ; il suffit, toutefois, à établir la réalité du pouvoir préventif des couleurs employées.

COULEUR employée.	MOMENT de l'intervention.	NOMBRE d'expériences.	NOMBRE de jours de survie (sur les témoins).	OBSERVATIONS
A	24 heures av. l'infection.	2	2 et 3 jours.	
Cl	— — —	1	6 jours.	
A	Qq. heures av. l'infection.	2	3 et 7 jours.	
Cl	Lors de l'infection.	2	9 jours. ∞ (pas d'infection).	
A	24 heures apr. l'infection.	2	1 1/2 et 3 jours.	Pas de paras. dans le sg au moment de l'intervention.
Cl	— — —	1	9 jours.	— — —
A	48 heures apr. l'infection.	1	4 jours.	Pas de paras. dans le sg.
Cl	— — —	1	7 jours.	Parasites rares dans le sg.
A	72 heures apr. l'infection.	2	2 jours 1/2. 6 jours 1/2.	Pas de paras. dans le sg. Parasites assez nombr.

Nous ferons remarquer, en terminant, que les survies, réalisées par le mode de traitement qui nous occupe, sont uniquement liées à un accroissement, plus ou moins grand, de la période d'incubation ; la maladie, une fois déclarée, suit constamment son cours habituel.

TRAITEMENT CURATIF

C'est sur lui qu'ont porté principalement nos études. Avant d'entrer dans le détail des faits, nous résumerons (toujours sous la forme d'un tableau) le résultat de 86 expériences comparatives, entreprises avec 6 couleurs : Cl, A, A', α , T et Ph. Les animaux ont été traités de quelques heures à 1 jour 1/2 après l'apparition des parasites, c'est-à-dire de 1 à 2 jours avant la mort. Sous l'influence de la médication, les trypanosomes ont *constamment* disparu. *Le plus souvent* cette disparition n'a été que momentanée, et nous avons observé des *rechutes* au bout d'un temps plus ou moins long (que l'on peut évaluer schématiquement à 12 jours, si l'on prend la « moyenne des moyennes » de notre tableau); mais, *dans une minorité de cas, les parasites ont été définitivement détruits*. A ce propos, il importe de *bien spécifier ce que nous entendons par guérison*. Parmi les souris, débarrassées de leurs parasites à la suite d'une seule injection de telle ou telle couleur, les unes ont pu être conservées très longtemps (jusqu'à un an), les autres ont succombé à des intervalles variés. Lorsque ces intervalles se sont montrés *très supérieurs* à la période qui sépare les rechutes les plus tardives du traitement, nous avons considéré les sujets comme *indubitablement guéris*, nous basant sur ce fait (facile à vérifier) que les sujets neufs, gardés au laboratoire dans les mêmes conditions de vie, offraient une mortalité tout à fait comparable. La chromothérapie ne saurait, est-il besoin de le dire, ni prolonger l'existence, si brève, des souris, ni accroître en rien la résistance de ces animaux à l'endroit des divers agents parasitaires (bactéries, coccidies, ténias) auxquels elles paient un lourd tribut. Aussi bien, le tableau ci-joint indiquera à quel point nous avons été scrupuleux; la guérison d'une souris, morte sans trypanosomes 45 jours après le traitement, est considérée comme douteuse! Aller plus loin serait tomber dans une absurde exagération.

COULEUR employée.	NOMBRE de souris traitées.	NOMBRE de guérisons.	NOMBRE DE JOURS compris entre le traitement et la rechute.		OBSERVATIONS
			Chiffres extrêmes observés.	Chiffres moyens (en nombres ronds).	
Cl	10	3	7-47 jours.	12 jours.	
A	26	5	5-15 jours.	10 jours.	On a expérimenté avec deux échantillons de couleur A, dont l'activité n'était pas tout à fait identique.
A'	9	3	9-11 jours.	10 jours.	Une des guérisons est douteuse (l'animal a été sacrifié 21 jours seulement après le traitement; son sang et ses organes ne se sont pas montrés infectants.)
α	13	3	9-23 jours.	12 jours.	Deux guérisons sont douteuses (animaux morts sans parasites, 35 et 45 jours après le traitement). — Par contre, la rechute, survenue après 23 jours, n'était peut-être qu'une réinfection due à ce que l'animal avait dévoré le cadavre d'une autre souris naganée.
T	13	1	5-21 jours.	12 jours.	
Ph	15	1	7-15 jours.	12 jours.	Guérison certaine, la souris n'avait pas de parasites 52 jours après le traitement.

On voit que l'ensemble de nos 86 expériences justifie ce que nous annonçons dans la partie chimique de notre travail, à savoir que les couleurs Cl, A, et A' sont les meilleures de toutes — qu'à leur demeure inférieur — que T ne guérit qu'exceptionnellement — et que Ph ne saurait convenir non plus pour le traitement en une seule séance. On voit aussi que la couleur Cl conserve la supériorité que nous lui avons déjà reconnue sur A et qu'elle paraît bien dépasser également A'.

Entrons maintenant dans *quelques détails, au sujet de la disparition des parasites*. Cette disparition demande 24 à 48 heures (très rarement davantage) et sa durée se montre

d'ordinaire proportionnelle au nombre des trypanosomes présents lors de l'intervention. Il existe toutefois des exceptions ; en voici une, prise au hasard.

Une souris (16 grammes) reçoit 0^{gr},4 de T., alors que son sang contient encore de rares tryp. : le lendemain, tryp. rares ; le surlendemain, tryp. rares ; le 3^e jour, tryp. disparus.

Comment a lieu la disparition ? L'étude complète de ce problème exigerait, à elle seule, un travail spécial. Nous nous contenterons donc d'esquisser les traits principaux du phénomène. Si l'on l'examine le sang, au moment de la décroissance des parasites, on s'aperçoit que les mouvements de nombre d'entre eux sont devenus plus lents ; le corps des trypanosomes apparaît plus condensé, fusiforme, et offre cet aspect granuleux qui ne s'observe normalement que lors de la mort, et surtout après la mort, des sujets infectés. Sur les préparations colorées par les méthodes ordinaires, il est aisé de retrouver les parasites en voie d'involution ; ce qui frappe alors, plus encore que le raccourcissement de leur corps, c'est l'abondance de grosses granulations violet foncé, qui bourrent leur protoplasme. Le noyau a conservé sa forme et ses contours, mais il semble souvent moins chromophile. Il est possible que certains granules aient passé dans le cytoplasme et y soient devenus des centres d'agglomération pour les substances basophiles de celui-ci ; d'où l'origine des grosses granulations, qui se trouveraient ainsi posséder, jusqu'à un certain point, une valeur *chromidiale* (cf. les trophochromidies d'*Actinosphaerium*). Les phénomènes que nous venons de rapporter brièvement et qui s'observent avec *toutes* les espèces de trypanosomes, s'accompagnent, d'ordinaire, de *leucocytose* et l'on rencontre, dans les globules blancs, des débris de parasites englobés, souvent très reconnaissables. Le mode de disparition des agents infectieux est, en somme, le même qu'avec le sérum humain, et, à la rapidité près, qu'avec les arsenicaux¹.

Ceci nous amène à faire connaître, une fois pour toutes, la *vitesse de disparition des divers trypanosomes* chez les animaux traités, soit par les arsenicaux, soit par nos « bonnes couleurs ». La disparition a lieu (dans la majorité des cas) :

1. Voir LAVERAN et MESNIL, *Trypanosomes et Trypanosomiasés*, Paris, Masson, 1904, *passim*.

- En moins de 24 heures : avec l'ac. arsénieux et l'atoxyl (*ubi infra*);
- En 24 heures environ : avec A (souvent moins de 24 h.) et A' (rarement plus de 24 h.);
- En un peu plus de 24 heures : avec Cl et Ph;
- En 24-48 heures : avec T;
- En 48 heures, ou plus : avec α .

Il était indiqué de rechercher comment les couleurs (et les arsenicaux) se comporteraient, *in vivo*, vis-à-vis des parasites. Pour Ehrlich et Shiga, le Trypanroth demeure inactif; pour Thomas, il manifeste un léger pouvoir microbicide, appréciable seulement après plusieurs heures de contact. Nous avons expérimenté, avec Cl, le plus efficace de nos médicaments colorés. Nous opérions avec une solution saturée de Cl dans du sérum de cheval chauffé (1/2 heure à 55°) et conservé au laboratoire depuis longtemps. En goutte pendante (18°-20°), nous n'avons noté aucune action spéciale, imputable à la couleur; au bout de 1-2 heures, les trypanosomes étaient devenus presque tous immobiles, mais pareille chose s'observait avec les préparations témoins. L'atoxyl, ajouté en poudre à une goutte de sang infecté, ne s'est pas montré plus microbicide.

L'expérience prouve, avons-nous dit, que les *rechutes* sont fréquentes après le traitement. *Que deviennent les parasites pendant le temps qui sépare le traitement de la rechute?* Il est impossible, pour le moment, de répondre nettement à cette question. Toutefois, les faits que nous allons rapporter permettent de discuter déjà certains points du problème. Nous avons sacrifié 8 animaux, traités par A et par Ph, de 4 à 10 jours après l'administration de ces couleurs, alors qu'une étude histologique attentive du sang n'y laissait voir aucun trypanosome. Le sang et les viscères de ces animaux ont été inoculés à des sujets neufs; le tableau suivant indique le résultat de ces inoculations.

COULEUR employée.	INTERVALLE DE TEMPS compris entre l'injection de la couleur et la mise à mort de l'animal.	RÉSULTATS DE L'INOCULATION				
		Du sang.	Du foie.	De la rate.	Des reins.	De l'encéphale.
A	4 jours.	o	o	o	o	+
A	7 jours.	o	o	o	o	o
A	10 jours.	o	o	o	o	o
Ph	7 jours.	o		o		o
Ph	3 jours.	o		o		o
Ph	3 jours.	o		o		o
Ph	8 jours.	+	+	+		+
Ph	9 jours.	+	+	+	o	o

REMARQUES. *Expériences A.* — 2 souris, sur 3, n'ont donc pas montré de parasites, alors que la proportion des guérisons chez les « sujets-mères » (sujets traités par A), est seulement de 1/3.

1^{re} expérience Ph. — Les « sujets-mères » avaient été traités à forte dose; néanmoins, chez 3 sur 4 de ces animaux gardés comme témoins, il y a eu rechute : les parasites ont reparu dans le sang après 11, 12 et 14 jours (la 4^e souris a succombé en 18 jours 1/2; elle n'avait pas encore rechuté au bout de 17 jours).

2^e expérience Ph. — Les « sujets-mères » avaient reçu, ici, une dose plus faible que dans la première expérience (exactement 1 centigramme pour 20 grammes). Les rechutes, chez 3 animaux, gardés comme témoins, ont eu lieu après 7, 8 et 9 jours; un 4^e animal n'a pas rechuté (fait *unique* dans l'histoire de Ph.). Par conséquent, on peut dire que les deux « sujets-mères », sacrifiés après 8 et 9 jours, avaient virtuellement rechuté. Bien que l'examen microscopique n'ait montré aucun trypanosome dans le sang.

Quelles conclusions est-on autorisé à tirer des recherches précédentes? Tout d'abord, l'expérience démontre que la proportion de souris en instance de rechute apparaît moins considérable qu'on ne l'eût pensé *a priori*. Par contre, ainsi qu'il était possible de le prévoir, plus on se rapproche du moment des rechutes et plus on a de chances de rencontrer le sang et les organes infectants; la comparaison des deux séries Ph le prouve surabondamment. Nous devons, en passant, attirer l'attention sur la première souris A, dont l'encéphale seul a

transmis le Nagana; s'il est téméraire d'affirmer qu'un animal aurait guéri, du fait que ses organes ne se sont pas montrés infectieux, ne l'est-il pas davantage de formuler une telle opinion, après inoculation exclusive du sang, comme on le fait souvent?

Demandons-nous maintenant la raison de tant d'inoculations négatives. On ne saurait incriminer l'injection simultanée du virus et de la couleur (contenue dans les humeurs et les cellules), comme le prouvent à la fois l'existence d'une minorité de résultats positifs et l'expérience directe suivante :

On administre 1^{gr},2 de A à 2 souris de 17 grammes. On sacrifie celles-ci au bout de 5 et 9 jours : on injecte, à des sujets neufs, leur sang et la pulpe de leurs viscères, additionnés (avant le broyage pour les organes) d'une trace de sang virulent. Les animaux inoculés contractent le Nagana typique des souris de passage (incubation : 2-3 jours, évolution normale).

Il faut donc s'adresser aux modifications quantitatives ou qualitatives subies par les trypanosomes. Il est évident que le faible nombre des germes doit être pour beaucoup dans les résultats obtenus; et, si l'on compare entre elles les deux séries Ph, on acquiert la conviction que l'innocuité du sang et des organes, contractée dans la première de ces séries, tient manifestement à ce que les animaux se trouvaient encore loin de l'époque de la rechute. D'autre part, les parasites demeurés dans l'organisme y sont certainement exposés à diverses influences nuisibles. On conçoit donc que leur état physiologique puisse s'en ressentir; la maladie à laquelle ils donneront naissance reflétera alors cet état physiologique anormal. C'est ainsi que le sang de la première souris de la 2^e série Ph (sacrifiée après 8 jours), inoculé à un animal neuf, lui a communiqué le Nagana (en moins de 5 jours) et que ce Nagana n'a déterminé la mort qu'après 16 jours 1/2. Une telle survie n'est jamais observée avec le virus de passage.

Comment évoluent les rechutes? Tantôt les animaux se comportent tout à fait comme des souris neuves, inoculées pour la première fois: tantôt, ils « traînent », plus ou moins long temps, avec de très nombreux trypanosomes dans le sang.

Qu'arrive-t-il quand on traite les rechutes? Il convient de distinguer 2 cas, suivant que le sujet a reçu l'une des 5 couleurs : Cl, A, A', α et T — ou bien la couleur Ph. Le tableau

Expérience du 21 octobre 1905. — *Souris nagayés*.

17-10-1905. — *Souris naines*.

		DÉTAIL DES TRAITEMENTS ET DES EXAMENS DE SANG																								RÉSULTATS et observations.	
		Octobre 1905.												Novembre 1905.													
		24	25	26	27	28	29	30	31	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	Décembre 1905			
		nr	r	0	0	0	0	0	0	r	an	tn	tn	+													
		1,2								1,2																	
C1	17 gr.	1	nr	r	0	0	0	0	0	0	r	0	r	tn	+											Meurt de Trypanosomes.	
										0,9																Meurt de Trypanosomes. Cachectique.	
	16 gr.	1	nr	nr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Guérison définitive d'emblée.	
																										Guérison définitive d'emblée.	
A	20 gr.	1,5	nr	r	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Meurt nuit 19-20 idem, sans Trypan., cachectiq. et intoxic.	
	16 gr.	1,2	an	r	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Meurt de Trypanosomes.	
	17 gr.	1,3	nr	r	0	0	0	0	0	an	an	tn	tn	+													
										1,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	19 gr.	0,45	nr	nr	nr	0	0	nr	0,65	0	0	0	0	tr	an	+											
α	17 gr.	0,6	nr	an	r	0	0	0	0	n	n	0	0	0	0	0	r	+									
										0,7							0,6										
	17 gr.	0,6	nr	an	r	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
																	0,65										
	18 gr.	0,5	r	nr	0	0	nr	n	an	0	0	0	0	0	nr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
										0,5					0,5												
T	17 gr.	0,15	an	an	0	0	0	0	0	0	0	0	0	nr	+												
										0,15					0,5												
	18 gr.	0,5	nr	nr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	nr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
														0,45													
	17 gr.	1	nr	nr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
														1,2													
Ph	17 gr.	0,9	nr	r	0	0	0	0	0	nr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
										1																	
	18 gr.	1	nr	nr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
										tn	+																
	20 gr.	0,6	nr	r	0	0	nr	an	r	0	0	0	0	an	nr	tn	+										
										0,65					0,5	0,6											
Atoxyl	17 gr.	0,5	nr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	nr	0	0	0	0	0	0	0		
										0,5								nr	0	0	0	0	0	0	0		
	16 gr.	0,4	nr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0	0	0	0	0	0	0		
		Intervention trop tardive.																									
		Meurt avec Trypan. très nombreux, peut-être intoxicé.																									
		Meurt intoxicé.																									

Les témoins meurent en 4 jours 1, 2. — Abréviations : r, Trypan. rares ; nr, non rares ; an, assez nombreux ; n, nombreux ; tn, très nombreux ; +, mort de l'animal. Les chiffres de la 2^e ligne consacrée à chaque animal indiquent en gr la dose de médicament inoculée. — Nota. Dans cette expérience, α s'est montré inférieur à ce qu'il est en général.

Les témoins meurent en 4 jours 1/2. — AMÉLIORATIONS : r, Trypan. rares ; nr, non rares ; an, assez nombreux ; n, nombreux ; tn, très nombreux ; +, mort de l'animal. Les chiffres de la 2^e ligne consacrée à chaque animal indiquent en egr la dose de médicament inoculée. — NOTA. Dans cette expérience, α s est montré inférieur à ce qu'il est en général.

ci-joint, concernant une expérience comparative, où l'atoxyl *ubi infra*) figure à côté des couleurs Cl, A (A' donne les mêmes résultats que A), α , T et Ph, souligne nettement cette distinction.

1^{er} cas. — Il ne faut guère compter sauver les animaux avec les couleurs Cl, A, A', α et T. Lors de la première rechute, on arrive d'ordinaire à faire disparaître les parasites pour un temps donné; toutefois, certains sujets sont déjà devenus très sensibles à la couleur et périssent intoxiqués, en quelques heures ou en quelques jours (sans trypanosomes, dans ce dernier cas). Lors de la seconde rechute, la sensibilité à la couleur se manifeste bien plus fréquemment; en outre, on commence à rencontrer des souris trop débiles pour supporter un nouveau traitement. La proportion d'animaux arrivant à la 3^e rechute (et, *a fortiori*, à la 4^e et à la 5^e) est donc, fatalement, des plus limitée. Ajoutons que, dans un groupe de cas de moins en moins exceptionnels à mesure que s'accumulent les rechutes (très rarement dès la première rechute), la couleur se montre totalement inactive vis-à-vis des trypanosomes. Faisons remarquer, en terminant, qu'aucune couleur, y compris T, ne permet d'obtenir, dans le traitement du Nagana, ces longs intervalles de rétrocession des parasites, observés dans le Caderas par Ehrlich et Shiga et nous-mêmes après l'administration de T, et pouvant aller jusqu'à 60 jours.

2^e cas. — Fait curieux, le dérivé Ph, quasi insuffisant à faire disparaître les agents infectieux en une seule séance, y parvient au contraire très souvent, après la 4^{re} et même la 3^e rechute, sous la condition que les souris ne soient pas devenues hypersensibles à son égard.

Cette propriété, si intéressante, de Ph, nous a suggéré l'idée de tenter, grâce à cette couleur, le *traitement préventif des rechutes*. 7 jours après la première administration de Ph (1 centigramme), on injectait aux animaux, débarrassés temporairement de leurs trypanosomes, une dose inférieure à la dose thérapeutique (1/2 à 2/3 de centigramme) : la guérison définitive a pu être obtenue, par ce moyen, avec 3 souris sur 4.

Nous nous sommes demandé si les doses de : Cl, A, A', α et T, administrées aux animaux lors de l'intervention initiale, ne pourraient point être abaissées, afin d'éviter l'hypersensibilité qui se manifeste déjà à la première rechute. L'expérience a

prouvé qu'il était malheureusement impossible de s'engager dans cette voie, et un simple coup d'œil jeté sur le tableau suivant suffira à démontrer qu'on doit « frapper fort » dès le début, si l'on veut obtenir un pourcentage convenable de guérisons.

COULEUR employée.	POIDS des animaux.	DOSE injectée.	RÉSULTAT OBTENU
A	18	1, 10 cgr.	Retard < 12 heures.
A	21	1/4 cgr.	Retard de 2 jours (pas de disp. des try.).
A	17	1 2 cgr.	Disp. des try. en 24 h. Rechute apr. 5 jours.
A	15	1 cgr.	Disp. des try. en 24 h. Rechute apr. 11 jours.
Cl	14	0 ^{esr} ,3	Disp. des try. en 48 h. Rechute apr. 5 jours.
Cl	19	0 ^{esr} ,5	Disp. des try. en 3 j. Rechute apr. 4 jours.
Cl	13	0 ^{esr} ,5	Disp. des try. en 24 h. Rechute apr. 14 jours.
Cl	16	0 ^{esr} ,7	Disp. des try. en 24 heures. <i>Pas de rechute</i>

Pour montrer combien la question des doses est importante, ajoutons que, chez les souris traitées avec Ph, l'intervalle entre l'administration de la couleur et la rechute est descendu de 12 jours à 8 jours, en diminuant la dose de 1/10 seulement. C'est là un fait important, si l'on considère que, dans le cas d'une pleine dose, on peut intervenir à nouveau d'une façon efficace, tandis que, dans celui d'une dose trop faible, on est empêché parce que l'animal est encore trop sensible à la couleur au moment où il faudrait répéter l'injection de celle-ci.

Nos études sur le traitement du Nagana expérimental des souris par les « couleurs de benzidine » nous amènent à conclure que le dérivé Cl (*Bayer*) représente le meilleur médicament que l'on puisse opposer aujourd'hui à cette infection constamment et rapidement mortelle. Les statistiques seraient encore plus favorables, pensons-nous, si Cl ne possédait point la fâcheuse propriété de déterminer souvent des *eschares* au niveau de la zone d'application. Ces *eschares* surviennent très fréquemment et arrivent parfois à dénuder la majeure partie du dos des sujets. Malgré cela, beaucoup d'entre eux résistent à cette complication thérapeutique. Emprasons-nous d'ajouter — au point de vue de l'emploi de Cl chez les

grands animaux — que, dès qu'on s'adresse à des espèces moins petites, se prêtant aux injections intra musculaires, l'inconvénient en question disparaît totalement. C'est ainsi que l'on peut introduire, dans chacune des masses musculaires de la fesse d'un cobaye (de 500 grammes), 10 centigrammes de Cl (soit 10 c. c. de solution à 1 0/0) sans le moindre inconvénient; le cobaye n'accuse, d'autre part, qu'une perte de poids insignifiante et transitoire.

Lorsque, chez les grands animaux, le traitement par Cl n'aura pas réussi à faire disparaître définitivement les trypanosomes, il sera indiqué, croyons-nous, de réitérer la médication en s'adressant à Ph (*Bayer*). Nous pensons également que l'on peut fonder des espérances légitimes sur la thérapeutique en deux temps, avec la seule couleur Ph (*ubi supra* : traitement préventif des rechutes).

TRAITEMENT PAR LES ARSENICAUX

Nous allons, maintenant, rapporter brièvement un certain nombre d'expériences personnelles entreprises par 6 dérivés arsenicaux différents (solutions aqueuses, administrées par la voie hypodermique). Ces expériences nous ont semblé intéressantes à faire connaître, au double point de vue de la comparaison des dérivés de l'arsenic entre eux et avec les « couleurs de benzidine ».

TRAITEMENT PRÉVENTIF

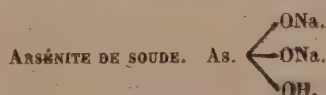
Il n'a été mis en œuvre qu'avec l'*atoxyl*, lequel représente le plus efficace des composés arsenicaux vis-à-vis des diverses trypanosomiasés étudiées, par nous, à ce point de vue. Dans le tableau ci-joint, l'*atoxyl* a été injecté à la dose de 5 milligrammes pour des souris de 20 grammes.

POIDS des animaux.	MOMENT de l'intervention.	RÉSULTATS OBTENUS
15 gr. 5	24 heures av. l'infection.	Les trypan. ont apparu comme chez le témoin. L'animal a reçu une nouvelle dose d'atoxyl (4 cgr.) au moment où ils étaient devenus très nombreux; les trypan. ont disparu et n'ont pas reparu.
17 gr.	23 heures av. l'infection.	Les trypan. ont apparu avec 2 jours de retard sur le témoin.
21 gr.	16 heures av. l'infection.	Les trypan. n'ont pas apparu.
18 gr.	Lors de l'infection.	Incubation prolongée (9 jours), puis signes ordinaires et mort.
15 gr.	— —	Les trypan. n'ont pas apparu.
19 gr.	— —	Incubation prolongée (10 jours au lieu de 2).
17 gr.	24 heures apr. l'infection.	L'animal meurt en 5 jours, sans trypan. (intoxication).
15 gr.	3 jours après l'infection (expérience faite à titre comparatif).	(Trypan. non rares au moment de l'intervention). Les parasites disparaissent et reparaissent après 6 jours.

Le pouvoir préventif de l'atoxyl ressort nettement des recherches qui viennent d'être résumées. Ces recherches démontrent également que la période d'intervention efficace, avant l'infection, est plus brève ici qu'avec les couleurs.

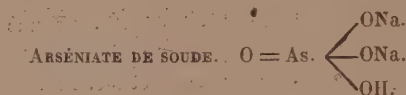
TRAITEMENT CURATIF

Il a été étudié avec les 6 dérivés suivants :



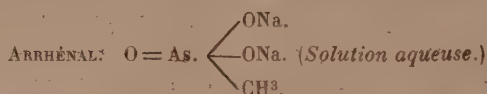
Employé sous la forme suivante $\begin{cases} \text{Anhydride arsénieux.} & 1 \text{ gramme.} \\ \text{Carbonate de soude.} & 1 \text{ gramme.} \\ \text{Eau distillée.} & 2,00 \text{ gramme.} \end{cases}$

— 1/2 décimilligramme d'*anhydride arsénieux* ne détermine qu'une simple diminution du nombre des parasites; 1 décimilligramme les fait disparaître, mais tue la moitié des animaux par intoxication rapide.

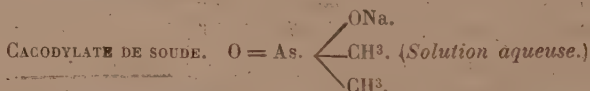


Employé sous la forme de « liqueur de Pearson ».

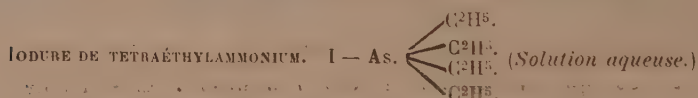
— 1 décimilligramme d'*anhydride arsénique* se montre inactif; 1 décimgr. 5 représente la dose thérapeutique; 2 décimilligrammes font périr les souris en deux heures.



— 5 milligrammes et moins (toujours pour des souris de 20 grammes) demeurent inefficaces (cf. expériences anciennes de Laveran et Mesnil sur les rats); 10 milligrammes font, au contraire, disparaître les trypanosomes.



— 15 milligrammes se montrent inactifs; 20 milligrammes également, et, de plus, la moitié des sujets succombent.



(Echantillon dû à l'obligeance de M. le Dr Chassevant.)

— 2 milligrammes demeurent inefficaces; 5 milligrammes tuent rapidement.



— 4-6 milligrammes représentent la dose thérapeutique (toujours pour des souris de 15-20 grammes); il convient de ne pas trop la dépasser.

Parmi les 6 dérivés arsenicaux qui précèdent, 4 seulement se sont donc montrés actifs; le tableau ci-joint permettra d'apprécier leur valeur relative.

DÉRIVÉ EMPLOYÉ (et dose pour des souris de 20 grammes).	NOMBRE de souris traitées	NOMBRE de guérisons.	NOMBRE DE JOURS compris entre le traitement et la rechute.	
			CHIFFRES extrêmes observés	CHIFFRES moyens.
Atoxyl (4-6 mgr.).	8	2	6-23 jours.	12 jours.
Arrhénal (10 mgr.).	1	0	5 jours.	5 jours.
Arsénite de Na (1 décimgr. d'anhydride arsénieux.)	2	0	1-4 jours.	3 jours.
Arséniate de Na (1 décimgr. 5 d'anhydride arsénique.)	2	0	1-2 jours.	1 j. 1/2.

Le meilleur des 4 arsenicaux actifs est donc l'atoxyl; c'est aussi le seul qui rentre dans notre « théorie de l'amidogène ». (Voir la première partie de ce travail.)

L'arséniate de soude se montre peu efficace; on voit que son efficacité augmente par substitution de CH^3 à OH (*arrhénal*) et disparaît par substitution d'un second CH^3 à l'un des ON_a (*cacodylate de soude*).

L'arsénite de soude apparaît supérieur à l'arséniate (suppression de l'atome d'O, uni exclusivement à l'atome d'As).

L'iodure de tétraéthylammonium ne vaut rien (multiplicité des radicaux alcooliques unis à As).

Le nombre des dérivés arsenicaux, étudiés par nous, était beaucoup trop faible pour nous permettre de rechercher les lois qui président à l'efficacité de certains d'entre eux. Aussi nous sommes-nous contentés de noter, en passant, les quelques remarques que nous avait suggérées la comparaison de leur formule chimique avec la présence, le degré ou l'absence d'activité, observés chez les animaux naganés.

Pour terminer ce qui a trait à l'*atoxyl*, nous dirons que, chez les souris qui présentent des trypanosomes excessivement nombreux, ce médicament ne saurait donner de bons résultats (contrairement à l'opinion de Thomas); tantôt les animaux succombent avant que le médicament ait produit son effet; tantôt les trypanosomes sont détruits, mais l'animal meurt intoxiqué.

TRAITEMENT DU MAL DE CADERAS EXPÉRIMENTAL DES SOURIS

Nous n'avons rien à dire au sujet du *traitement préventif* du Mal de caderas, réalisé par Ehrlich et Shiga avec le Trypan-
roth.

Nos recherches sur le *traitement curatif* en une seule séance se trouvent résumées dans le tableau suivant.

COULEUR employée.	NOMBRE de souris traitées.	GUÉRISONS	NOMBRE DE JOURS compris entre le traitement et la rechute.		OBSERVATIONS
			CHIFFRES EXTRÊMES observés.	CHIFFRES MOYENS (en nombres ronds)	
Cl	4	2	8-11 jours.	10 jours.	
T	14	6	10-40 jours.	19 jours.	2 guérisons douteuses (souris tuées accidentellement, 2 mois après le traitement).
A	15	1	7-12 jours.	8 jours.	Guérison douteuse (animal mort, sans trypan., 45 j. ap. le traitement.)
A'	6	1	8-11 jours.	10 jours.	Guérison douteuse (sacrifiée, mourante, 24 j. apr. le traitement; sang, rate et encéphale non infectants).
α	5	1	12-16 jours.	14 jours.	Guérison douteuse (souris morte 30 j. ap. le trait., sans trypanos.).
Ph	4	0	9-13 jours.	10 jours.	

Le résultat de ces 49 expériences confirme ce que nous avançons dans la partie chimique de notre travail : les meilleures couleurs sont, incontestablement, Cl et T; puis A, A' et α ; quant à Ph, il ne vaut rien. Sauf en ce qui concerne Cl (et Ph), *l'ordre d'activité n'est donc plus le même que pour le Nagana*; nous nous permettons d'insister, à nouveau, sur ce fait intéressant.

Les couleurs étudiées par nous font disparaître les parasites tantôt pour toujours, le plus souvent pour un temps variable. Il était indiqué de rechercher, ainsi que nous l'avons

déjà fait à l'occasion du Nagana, si le sang et les viscères des sujets, sacrifiés durant cette période, se montreraient ou non infectants.

Le tableau ci-joint répond à cette question.

COULEUR employée.	INTERVALLE DE TEMPS compris entre l'injection de la couleur et la mise à mort de l'animal.	RÉSULTATS DE L'INOCULATION				
		Du sang.	Du fœte.	De la rate.	Des reins.	De l'encéphale.
Cl	41 jours.			o		o
A	6 jours.	o	o	o	o	o
A'	5 jours.	o	o	o	o	o
	41 jours.	+				o
	23 jours.	o		o		o
α	Souris traitée par α; disparition des tryp.; rechute après 16 jours; nou- veau traitement par α; disparition des tryp.; mise à mort de l'animal après : 8 jours.	o		o		o

Sur 19 inoculations, une seule a donc été positive et elle se rapporte au sang.

Ainsi qu'Ehrlich et Shiga, nous avons été frappés du temps relativement fort long qui sépare ordinairement le traitement de la première rechute et chaque rechute de la suivante, lorsque la médication a été entreprise avec le Trypanroth.

Qu'arrive-il quand on traite les rechutes? Cela dépend de la couleur employée; avec Cl, T (Ehrlich et Shiga, et nous-mêmes), et surtout α, l'intervention est suivie de succès dans un certain nombre de cas; avec A, A' et Ph, elle échoue constamment.

Le tableau suivant, qui concerne une expérience comparative portant sur les couleurs Cl, T, A, α et Ph, permettra de se faire une idée très exacte de la chromothérapie du Mal de cadéras.

TRAITEMENT DU SURRA EXPÉRIMENTAL DES SOURIS

TRAITEMENT PRÉVENTIF

Il n'a été étudié que pour Cl; le tableau suivant résume les expériences entreprises avec cette couleur.

POIDS des animaux.	MOMENT de l'intervention.	RÉSULTATS OBTENUS
21 gr.	24 heures avant l'infection.	Les tryp. n'ont pas apparu.
21 gr.	Lors de l'infection.	Les tryp. n'avaient pas encore apparu après 32 jours, quand l'animal a succombé.
48 gr.	— —	Les tryp. n'ont pas apparu.
22 gr.	24 heures après l'infection.	Les tryp. n'ont pas apparu.
17 gr.	48 heures après l'infection.	(Pas encore de parasites dans le sang.) L'animal meurt, apr. 18 jours, sans trypanosomes.
19 gr.	72 heures après l'infection. (Expérience faite à titre comparatif.)	Rechute au bout de 8 jours (c'est le <i>seul</i> cas où le <i>traitement</i> du Surra par Cl ait échoué).

Inutile d'insister sur l'importance des résultats obtenus.

TRAITEMENT CURATIF

Malgré leur nombre relativement faible, nos recherches nous permettent de maintenir intégralement les conclusions données dans la première partie de notre travail. Les deux meilleures couleurs restent ici Cl et T, avec supériorité de Cl (4 guérisons d'emblée sur 5) sur T (3 guérisons sur 7); l'action curative de A et de A' est douteuse; celle de α et de Ph insuffisante. L'atoxyl se comporte comme ces deux derniers dérivés, dans le traitement en une seule séance; mais c'est le seul des médicaments employés par nous qui paraisse conve-

nir à la thérapeutique des rechutes, même quand on l'administre lors des rechutes consécutives à l'usage des couleurs (T et Ph).

Nous terminerons notre étude expérimentale en répétant, une dernière fois, que la couleur « dichlorobenzidine + acide H » (Bayer) constitue, à l'heure actuelle, le meilleur agent chimique que l'on puisse opposer aux 3 trypanosomiasés animales : Nagana, Mal de caderas et Surra. Son action préventive, tout à fait remarquable vis-à-vis du Surra, rendra Cl doublement précieux dans la lutte contre cette dernière affection.

TRAVAUX CITÉS

- BALFOUR. — *Journ. of. Path. a. Bacter.*, t. XI, mars 1906, p. 209.
- BRUCE. — *Further Report on the Tsetse Fly disease or Nagana in Zululand*, Londres, 1897.
- BRUMPT et WURTZ. — *C. R. Soc. Biologie*, t. LIX, 1^{er} juillet 1903, p. 61.
- EHRLICH et SHIGA. — *Berliner klin. Woch.*, 28 mars et 4 avril 1904, p. 329 et 362.
- FRANKE. — *Inaug. Dissertation Giessen*, Jena, Fischer, 1903. Voir aussi *Aerzt. Verein in Frankfurt a. M.*, 21 août 1903, in *Münch. mediz. Woch.*, n° 42, 1903.
- HALBERSTÆDTER. — *Centralbl. f. Bakter., I, Origin.*, t. XXXVIII, 13 avril 1903, p. 523.
- LAVERAN. — *C. R. Acad. Sciences*, t. CXXXIV, 1^{er} avril 1902, p. 735 ; t. CXXXVII, 6 juill. 1903, p. 45 ; t. CXXXVIII, 22 février 1904, p. 430 ; t. CXXXIX, 4 juill. 1904, p. 49 ; t. CXL, 30 janv. 1905, p. 287, et 17 avril 1905, p. 1084 ; t. CXLI, 10 juill. 1905, p. 94.
- LAVERAN et MESNIL. — *Ann. Inst. Pasteur*, t. XVI, 25 nov. 1902, p. 785.
- *Trypanosomes et Trypanosomiasés*, Paris, Masson, 1904.
- LINGARD. — *Report on Surra, etc.*, t. II, part. 4, Bombay, 1899, p. 61.
- DE MAGALHAES. — *Arch. Inst. roy. de Bact. Camera Pestana*, t. I, mai 1906, p. 171.
- NEAVE. — *Lancet*, 17 juin 1903, p. 1645.
- THOMAS. — *British med. Journ.*, 27 mai 1903, p. 1140. — THOMAS et BREINL. *Liverpool School of tropic. Med.*, mem. XVI, oct. 1903.
- WENDELSTADT et M^{lle} FELLMER. — *Deutsche mediz. Woch.*, 17 nov. 1904, p. 1711. — *Zeitschr. f. Hyg.*, t. LII, févr. 1906, p. 263. — *Sitzungsber. d. Niederrhein Ges. f. Nat. u. Heilkunde zu Bonn*, 26 janv. 1906.

INJECTION DES COULEURS DE BENZIDINE AUX ANIMAUX NORMAUX

Etude expérimentale et histologique.

PAR LE D^r G. BOUFFARD

Médecin-major des troupes coloniales.

Au moment où il a bien voulu nous accueillir dans son laboratoire, M. Mesnil s'occupait, avec M. Nicolle, du traitement des trypanosomiasés par les « couleurs de benzidine ». Ces messieurs nous ont offert d'étudier l'action de leurs médicaments colorés sur les animaux normaux et avant tout sur les souris, espèce la plus couramment employée dans leurs expériences. C'est le résultat de cette étude que nous publions aujourd'hui. Des recherches d'orientation avaient été faites, avant nous, par le D^r Pinoy qui a été assez aimable pour nous communiquer les résultats qu'il avait obtenus.

Jusqu'aux travaux d'Ehrlich et Shiga sur le *Trypanroth*, le rouge Congo semble avoir été la seule « couleur de benzidine » à laquelle se soient adressés les biologistes. Étudié histologiquement par Griesbach, il a été administré ensuite aux animaux à sang froid (voie intrapéritonéale) par Galeotti, dans ses recherches sur les colorations vitales. Tout récemment enfin, Schläpfer, dans son intéressant travail sur les plexus choroïdes, rapporte quelques expériences d'injection du rouge Congo à la grenouille et au lapin; chez ce dernier animal, l'auteur a noté l'absence de coloration du liquide céphalo-rachidien. Nous ne voyons rien de bien spécial à relever dans les travaux précédents, entrepris à un point de vue différent du nôtre.

Ehrlich et Shiga ont administré le Trypanroth à divers animaux (principalement aux souris) parfois *per os*, mais d'ordinaire par la voie hypodermique. Suivant ces auteurs, les sujets se teignent rapidement (le maximum de coloration étant atteint en 8-12 heures) et demeurent teintés pendant 6 à 10 semaines (suivant la dose reçue). Le Trypanroth formerait des combinaisons peu solides avec les parties constituantes de certaines cellules (granulations rouges) et ces combinaisons n'abandonneraient ensuite la couleur que fort lentement.

Franke, élève d'Ehrlich, ajoute les détails que voici, dans un travail récent. Le Trypanroth est fixé par tous les organes, sauf le système nerveux ; il se montre abondant dans le sang et l'urine, pendant les premiers jours qui suivent l'injection et peut encore y être retrouvé, à l'état de traces, après un mois ; la peau, au niveau du point d'introduction de la couleur, demeure rouge durant très longtemps (plusieurs mois) — en pâlisant peu à peu, bien entendu.

Nos recherches ont surtout porté sur la couleur : « Tolidine + acide H », que nous désignerons, par abréviation, sous le nom de « couleur A ». De toutes les couleurs, expérimentées dans le traitement du Nagana, c'est certainement une des meilleures ; c'est aussi l'une des plus inoffensives pour les animaux, car elle ne donne jamais d'eschares locales et affecte rarement l'état général d'une façon appréciable (sauf chez les sujets débiles ou de trop faible taille). Ajoutons qu'il y avait intérêt à savoir si ce dérivé, bleu, se comporterait comme le Trypanroth. L'expérience a montré qu'il en était ainsi ; d'ailleurs, les diverses *couleurs de benzidine susceptibles de teinter les souris*, étudiées par nous ou autour de nous, n'ont montré de différences qu'au point de vue de leur toxicité locale ou générale, et non au point de vue de leur mode d'élimination ou de leur localisation dans l'économie animale.

ÉTUDE DE LA COULEUR A, CHEZ LA SOURIS.

Nous étudierons, tout d'abord, les effets de l'*injection hypodermique* d'une dose inoffensive, soit 1 centigramme pour une souris de 15-20 grammes. Disons, de suite, que l'*ingestion* d'une quantité environ 20 fois plus grande produit les mêmes effets.

Cette dose inoffensive a été administrée, suivant les cas, à une ou plusieurs reprises. Nous avons opéré, autant que possible, sur des animaux de poids nettement supérieur à 15 grammes, les sujets moins gros pouvant offrir une sensibilité marquée au médicament coloré.

Après l'étude de la dose inoffensive (étude que nous avons surtout en vue dans ce travail), nous dirons quelques mots des accidents observés chez les animaux que l'on soumet à une intoxication plus ou moins sévère.

INJECTION D'UNE DOSE INOFFENSIVE

INJECTION UNIQUE

Nous allons décrire tour à tour : l'évolution de la coloration *in vivo* — l'aspect des divers tissus et organes, chez les sujets sacrifiés à des moments variés de cette évolution — et la répartition histologique de la couleur A, à ces périodes successives.

Evolution de la coloration in vivo.

Quelques minutes après l'injection sous-cutanée de 1 centigramme de couleur A, on voit la base de l'oreille prendre un faible ton bleuté. Après un quart d'heure, ce ton s'est généralisé aux parties de l'économie accessibles à l'examen externe, les muqueuses étant toutefois un peu plus colorées que le reste du gument (abstraction faite du point injecté). L'urine, émise à la suite d'une légère pression sur le ventre, offre une teinte marron. Après une demi-heure, l'oreille n'est pas encore bleue dans toute son étendue (les parties les plus teintées sont celles qui avoisinent les vaisseaux); les pattes, la queue et le museau sont d'un bleu clair, la conjonctive et les autres muqueuses (buccale, linguale...) d'un bleu plus intense; l'urine est lilas, le sang (prélevé à l'extrémité de la queue) marron, le sérum bleu clair. Après 1 heure, la peau montre un ton franchement bleu, dans toutes les régions glabres, et ce ton s'accuse de plus en plus, atteignant son intensité maxima en 12 heures. L'urine, d'un bleu franc après 6 heures, devient bleu foncé après 24; le sérum présente sa coloration la plus forte au bout d'un jour; enfin, les fèces affectent une teinte marron après 12 heures; les larmes sont colorées.

Les téguments ne commencent à pâlir qu'au bout de 8-10 jours; et les muqueuses se décolorent plus lentement. La région injectée demeure bleue bien longtemps après que la peau a repris son aspect normal. L'urine pâlit après 6 jours environ; après une vingtaine de jours, elle a récupéré sa couleur habituelle et n'en change point par addition d' H^2O^2 . Le sérum sanguin, encore bleu à la fin de la première semaine, n'offre plus trace de couleur vers le 10^e jour. Les fèces commencent à se décolorer après 6 jours et sont redevenues jaune clair vers le 10^e jour également. L'état général n'est point

touché ; sur 28 souris, pesées tous les 2 jours, nous n'avons noté qu'une faible émaciation initiale (2 grammes en moyenne), suivie d'un retour à la normale, puis d'un accroissement du poids ; deux sujets, conservés pendant 5 mois, avaient gagné plusieurs grammes.

Nous concluons donc : que la dose de 1 centigramme se montre réellement *inoffensive* ; que la couleur s'absorbe très rapidement ; qu'elle se fixe au niveau des téguments (surtout de ceux du point injecté) et des muqueuses, et y demeure longtemps fixée ; qu'elle *circule*, en quantité appréciable, pendant une dizaine de jours ; qu'elle s'élimine par l'intestin et les glandes, principalement le rein, et qu'on peut la retrouver encore aisément dans l'urine, alors qu'elle est devenue impossible à déceler dans le sérum.

Aspect des tissus et organes, chez les sujets sacrifiés à diverses périodes.

Chez les animaux sacrifiés après 24 heures (les souris ont toujours été tuées par saignée), on note les particularités suivantes. Le point injecté est plus fortement coloré que le reste des téguments, les muscles du dos et des membres demeurent incolores, mais leurs aponévroses sont franchement teintées. A l'ouverture de l'abdomen, le tube digestif présente une coloration bleue très inégalement répartie (certains points sont presque incolores) ; la vessie est bleue ; le testicule et l'épididyme, ainsi que l'ovaire, non pigmentés ; le foie montre une distribution irrégulière de la couleur ; la rate, le pancréas et les capsules surrénales demeurent normaux ; le rein offre une nuance bleue très intense, c'est le plus coloré de tous les viscères. Dans le thorax, les poumons et le cœur ont conservé leur teinte naturelle. Les glandes salivaires se montrent bleutées. Les divers ganglions lymphatiques, un peu hypertrophiés, ont pris une teinte bleue légère. Les tissus fibreux, élastique et osseux (y compris la moelle des os) sont franchement teintés. L'humeur aqueuse reste incolore.

Après 48 heures, la nuance des organes déjà bleus a plus ou moins foncé ; la rate s'est légèrement colorée. Les extraits aqueux des organes incolores ne se teintent pas par addition d'H²O². Après 3 jours, la rate a bleui davantage, les glandes

salivaires également, les capsules surrénales et les poumons sont légèrement teintés. Le maximum de coloration est atteint vers le 6^e jour, pour les organes susceptibles de fixer — ou tout au moins de laisser passer — le bleu.

La décoloration commence vers le 10^e jour ; elle se manifeste, tout d'abord, au niveau du tube digestif, des poumons et des glandes salivaires. Le 12^e jour, les *viscères* sont à peine teintés et la coloration de la peau a déjà nettement perdu de son intensité. Après une vingtaine de jours, l'organisme ne recèle guère de couleur (visible à l'œil nu) qu'au niveau de la région injectée, du rein et du foie.

En résumé (*macroscopiquement*) : *coloration intense et durable*, au niveau : du point injecté ; puis du rein ; puis du foie. — *Coloration plus ou moins marquée et plus ou moins durable*, au niveau : de la peau et des muqueuses ; des tissus fibreux, élastique et osseux ; de la vessie ; de la rate ; des ganglions lymphatiques ; du tube digestif ; des glandes salivaires ; des poumons ; des capsules surrénales. — *Coloration nulle*, au niveau : du système musculaire (y compris le myocarde) ; du système nerveux ; des organes génitaux internes ; du pancréas.

Répartition histologique de la couleur A.

Nous l'avons étudiée à l'état frais (dissociations et coupes par congélation) et sur des *pièces fixées et colorées* (fixation par le sublimé acétique et coloration par le brun de Bismarck). Nous sommes reconnaissant à M. Nicolle d'avoir bien voulu contrôler nos résultats.

Voici les résultats de cette étude :

REINS. — Granulations bleues abondantes, occupant le tiers environ des *tubes contournés* : ces granulations sont polymorphes et généralement volumineuses, et se montrent irrégulièrement réparties dans les cellules. Granulations, discrètes et fines d'ordinaire, dans les branches larges de Henle. Les glomérules, sains, ne contiennent que rarement des exsudats bleuâtres ; ces exsudats ont certainement reflué des tubes contournés, où ils sont moins exceptionnels. Les autres parties du rein n'offrent jamais de dépôts colorés.

FOIE. — Granulations bleues abondantes, dans les *cellules de*

Kupffer; un certain nombre de grains bleus, dans les *cellules interstitielles* des espaces portes.

RATE. — Un très faible nombre de *polynucléaires*, teints d'une façon pâle et diffuse, polynucléaires évidemment morts ou très malades; rares *mononucléaires*, contenant de la couleur sous forme de masses également pâles (lesquelles représentent, sans doute, les débris des polynucléaires colorés).

GANGLIONS LYMPHATIQUES, MOELLE OSSEUSE. — *De même.*

POUMONS. — Granulations dans les *cellules interstitielles*: elles semblent faire défaut dans les « cellules à poussière » qui contiennent, par contre, plus ou moins de particules charbonneuses.

TUBE DIGESTIF, PANCRÉAS, GLANDES SALIVAIRES, TESTICULES, MUSCLES et MYOCARDE, etc. — *De même.*

TISSUS FIBREUX. — *De même, encore.*

SYSTÈME NERVEUX. — *Aucune trace de couleur*, ni dans les cellules nerveuses, ni dans des éléments névrogliques.

En somme, la couleur est fixée, presque uniquement, par les cellules des tubes contournés du rein, les cellules de *Kupffer* du foie et les cellules interstitielles des divers organes et tissus. La coloration des organes tient, non seulement à la présence d'éléments contenant des granulations bleues, mais encore à celle de la couleur qui circule en nature dans le sang. On conçoit donc que la *vascularité* et la *transparence* de chaque organe jouent un rôle important dans l'aspect qu'il présente à l'œil nu. Et, comme les centres nerveux sont riches en substances grasses opaques, ils ne sauraient paraître bleus, malgré la présence de la couleur A dans le plasma qui les baigne.

A mesure que l'animal se décolore, l'examen histologique indique une diminution numérique et volumétrique des granulations intracellulaires.

Nous croyons que l'on peut se représenter comme il suit, sans chances d'erreur, le *sort de la couleur A* dans l'organisme de la souris. Injectée sous la peau, une portion de cette couleur se fixe localement, l'autre passe dans la circulation. Une fois dans la circulation, la couleur *filtre*, d'une part, au niveau des glandes autres que le rein (d'où la teinte anormale des larmes et des fèces) et *se fixe*, de l'autre, au niveau de certaines cellules, qui l'accumulent en leur intérieur sous forme de grains

bleus (cellules du rein, cellules de Kuppfer, cellules interstitielles de la trame des organes et des membranes fibreuses). Que devient la couleur fixée par les cellules? Pour les cellules rénales, la plus grande quantité passe certainement dans l'urine (et continue à y passer alors que le plasma sanguin n'offre plus trace de coloration anormale), mais il est possible qu'une faible proportion soit détruite *in situ*. Pour les autres cellules, nous n'avons aucune indication, concernant le sort de la couleur; peut-être une fraction retourne-t-elle en solution dans les humeurs, comme l'admettent Ehrlich et Shiga? En tout cas, *la décoloration des animaux comprend deux phases* : l'une brève, correspondant à la décoloration du plasma sanguin (par élimination et filtration de la couleur), l'autre bien plus longue, correspondant à celle des éléments cellulaires.

INJECTIONS RÉPÉTÉES

Si, chez un animal en voie de décoloration avancée, on renouvelle l'administration de 1 centigramme de couleur A, les phénomènes observés ne diffèrent en rien de ceux que nous venons de décrire d'une façon détaillée.

Nous avons pu, sans aucun danger, injecter aux souris 4 fois de suite, à 1 mois d'intervalle, 1 centigramme de couleur: certains des sujets ainsi traités, conservés ensuite pendant plusieurs mois, ont montré un accroissement de poids marqué.

INJECTION DE FORTES DOSES

Nous nous sommes servi, dans ces expériences (sur lesquelles nous passerons rapidement), de solutions à 2 0/0, afin de ne pas trop augmenter la masse de liquide introduite dans le tissu cellulaire.

2 centigrammes déterminent une émaciation notable, mais la mort reste exceptionnelle; elle survient, au contraire, régulièrement, si l'on renouvelle l'injection peu de jours après.

Avec 3 centigrammes (en 2 injections, à 1 heure d'intervalle), les sujets périssent dans un temps variable, mais toujours limité (10 heures-3 jours).

Après injection de fortes doses, la couleur offre la même répartition qu'après injection de la dose inoffensive.

ÉTUDE DE LA COULEUR A, CHEZ LE COBAYE ET LE LAPIN

Cobaye. — On peut introduire dans les muscles fessiers. jusqu'à 20 centigrammes de couleur (10 c. c. de solution à 1 0/0 de chaque côté), sans que le sujet en souffre aucunement. On peut aussi introduire au moins 5 centigrammes (5 c. c. de sol. à 1 0/0) brutalement dans le cœur (mthode de Ch. Nicolle), sans plus d'inconvénients; l'animal se colore alors avec une très grande rapidité, ainsi qu'on pouvait le prévoir d'avance.

Chez les cobayes qui ont reçu la couleur A. par une voie quelconque, la répartition de cette couleur se fait comme chez la souris; le *liquide céphalo-rachidien* demeure incolore.

Si, chez un cobaye fortement teinté. on pratique une saignée. que l'on reçoive le sang dans une solution concentrée de citrate de soude, et que l'on centrifuge. on constate que le plasma offre une nuance bleu foncé, mais que les leucocytes demeurent incolores (à l'examen histologique). Si, en même temps que l'on injecte de la couleur dans les muscles d'un cobaye, on introduit, dans le péritoine, 10 c. c. de sérum normal de cheval (chauffé 1/2 heure à 55°) et si, le lendemain, on prélève l'exsudat péritonéal 10 minutes après une injection préalable de 10 c. c. d'eau physiologique, on note que la sérosité de l'exsudat est colorée et que quelques leucocytes (assez rares) contiennent un peu de couleur (granulations fines et pâles). Cette expérience, comparée avec celle qui précède. porte à admettre que ce ne sont pas des constituants normaux des leucocytes qui ont ainsi pris le pigment, mais, sans doute, des substances issues du sérum de cheval injecté.

Le fait que la couleur A ne passe pas dans le liquide céphalo-rachidien invite à employer la méthode intra-rachidienne dans la « chromothérapie » de la maladie du sommeil.

Lapin. — On peut porter, sans nul inconvénient, 30 centigrammes de couleur (30 c. c. de solution à 1 0/0) dans les veines d'un lapin, en 3 fois, à 10 minutes d'intervalle. même en allant assez brutalement.

On peut introduire, sans dommage également, 1/2 centigramme (1/4 c. c. de solution à 2 0/0) dans le cerveau et, 8 jours après, injecter 1 centigramme (1/2 c. c. de la même solution). Rien ne prouve *a priori* que la voie intracérébrale ne se trouvera pas indiquée, un jour ou l'autre, dans le traitement des trypanosomiasés par les « couleurs de benzidine ».

Récolte et Conservation des Diptères

particulièrement des espèces qui piquent pour sucer le sang.

PAR M. E.-L. BOUVIER

Membre de l'Institut, Professeur au Muséum d'Histoire naturelle.

I

NOTIONS SUR LES DIPTÈRES

Caractères généraux (fig. 1). — Les Diptères sont des insectes à deux ailes, à téguments minces et peu résistants, à métamorphoses complètes. Ils n'atteignent jamais de grandes dimensions et, suivant leur taille, sont vulgairement désignés sous les noms de *mouches* ou de *moucheron*s. Le Taon du Bœuf compte parmi les plus grands, et les Moustiques se rangent parmi les petits; la Mouche commune est une espèce de dimension moyenne.



Fig. 1. — *Hematobia serrata* Rob.-Desv. : b œuf, a larve, c pupa, d femelle. D'après l'*Insect Life*, vol. II, p. 93. Cette mouche piqueuse est répandue en Europe et aux Etats-Unis.

1^o Les ailes. — Les deux ailes des Diptères sont minces et transparentes, quelquefois maculées de taches sombres, et toujours suivies de deux courts appendices en massues, les *balanciers*, qui représentent une seconde paire d'ailes non fonctionnelles. Ces dernières sont bien développées chez tous les autres

insectes doués de vol, sauf toutefois chez les mâles des Cochenilles, qui se distinguent d'ailleurs des Diptères par la présence de deux filaments caudaux. Ainsi, tout insecte muni de deux ailes et dépourvu de filaments caudaux appartient, sans contre-dit, au groupe des Diptères. Il est bon d'ajouter que les ailes ont disparu chez plusieurs Diptères parasites, qui passent leur existence tout entière sur le corps de certains Vertébrés à sang chaud; exemple, le Mélophage du Mouton (fig. 16).

2° *Les téguments*. — La couche de chitine, dans les Diptères, est toujours mince et le plus souvent peu résistante, ce qui rend ces Insectes très fragiles quand ils ont subi la dessiccation. Avec les liqueurs conservatrices, on a moins à craindre cette fragilité, mais les poils et les écailles du revêtement chitineux se détachent ou s'altèrent, ce qui modifie beaucoup la coloration, même quand l'animal a été retiré du liquide et desséché.

3° *Métamorphoses*. — Les Diptères sont presque tous ovipares. De l'œuf (fig. 1, *b*) sort une *larve* (*a*) annelée et vermiciforme, toujours dépourvue de pattes, qui se déplace par des mouvements ondulatoires. Après un certain temps de vie active, le jeune animal se transforme et passe à l'état de *nymphe* le plus souvent immobile; la nymphe prend le nom de *pupe* (*c*) quand elle est ovoïde et recouverte d'une couche chitineuse brunâtre. Sous les téguments nympaux s'élabore l'*adulte* (*d*), qui rejette sa prison de chitine pour prendre un définitif essor.

Ainsi caractérisés par ces trois états successifs, dont celui de nymphe sans mouvement, les Diptères nous offrent un excellent type d'Insectes à métamorphoses complètes. Il est bon d'observer, toutefois, que certains échappent à cette règle: les Moustiques, par exemple, qui restent mobiles durant leur période nymphale (fig. 4), et les Diptères pupipares (Hippobosque [fig. 13], Mélophage [fig. 16]), ainsi nommés parce qu'ils donnent naissance à des larves qui se transforment aussitôt en pupe.

II

LES DIPTÈRES PIQUEURS ET SUCEURS DE SANG

Les Diptères se divisent assez naturellement en deux grands groupes, les *Némocères* et les *Brachycères*, d'après la structure de leurs antennes. Dans le groupe des Némocères (fig. 2), les

antennes sont grêles, formées d'au moins 6 articles, souvent allongées et plumeuses; dans les Brachycères (fig. 1, *d*), elles restent courtes et ne comptent le plus souvent que *trois articles* bien distincts.

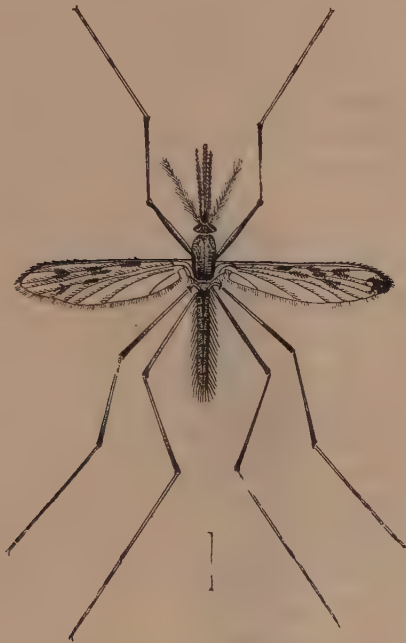


Fig. 2. — Un Moustique du paludisme, l'*Anopheles maculipennis* Meig., espèce européenne; femelle. D'après Théobald.

A chacun de ces groupes appartiennent des formes vulnérantes et d'autres, bien plus nombreuses, qui ne le sont pas. Dans chacun également, la faculté de *piquer* et de *sucer* appartient en propre aux femelles; les mâles ne piquent pas et se contentent de humer les substances liquides.

NEMOCÈRES PIQUEURS ET SUCEURS. — Les Némocères vulnérants sont tous de petite taille; en dehors de quelques formes signalées plus loin, ils se rangent tous dans deux familles très distinctes: la famille des *Culicidés* et celle des *Simuliidés*; l'une et l'autre remarquables par ce fait que leurs larves et leurs nymphes vivent et se développent dans l'eau.

1° *Culicidés.* — Les *Culicidés* sont vulgairement connus sous les noms de *Cousins* et de *Moustiques* (fig. 2). Ils ont le

corps grêle, les pattes longues, de grandes antennes ornées de poils, une trompe fine et allongée. Cette dernière est relativement réduite chez le mâle, qui présente des antennes de 15 articles fortement plumeux et, sur les côtés de la trompe, deux grands palpes maxillaires; dans la femelle, les antennes sont plus courtes et composées de 14 articles simplement pileux, les palpes ont des dimensions réduites et la trompe présente une longueur plus grande.

Ces insectes se trouvent surtout au voisinage des eaux douces, en particulier des mares, des bassins, des canalisations à

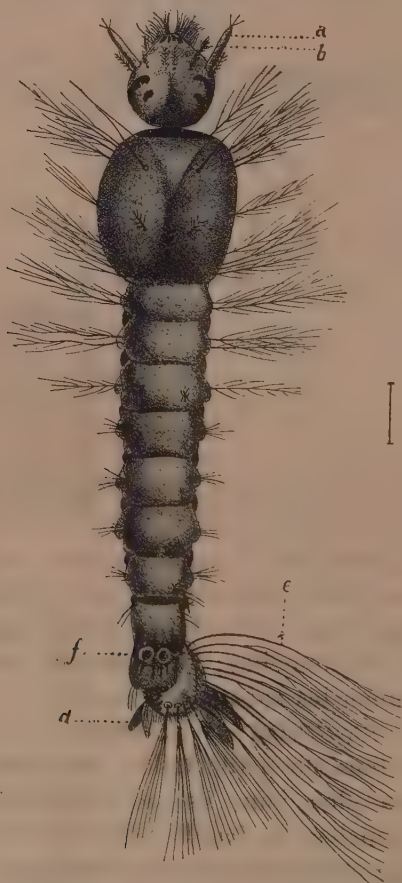


Fig. 3. — Larve d'*Anopheles* : *a* antennes, *b* palpes maxillaires, *d*, *e* nageoires caudales, *f* les deux orifices respiratoires ou stigmates. (Dans les larves de *Culex*, ces deux stigmates occupent le sommet d'un prolongement cylindrique latéralement situé.) D'après Théobald.

ciel ouvert et des eaux stagnantes. Ils déposent leurs œufs à la surface, tantôt isolés, plus souvent réunis en petits radeaux. De l'œuf sort une larve (fig. 3) allongée et très agile, qui présente sur chaque segment des faisceaux de soies : ces larves ont une tête bien distincte munie de deux taches oculaires, un thorax de dimensions plus grandes et, sur l'avant-dernier segment du corps, deux orifices respiratoires (*f*) qui affleurent simplement dans les *Anopheles*, tandis qu'ils se trouvent à l'extrémité d'un siphon plus ou moins saillant chez les autres Culicidés. De ce fait, il résulte que les larves d'*Anopheles* se tiennent horizontalement près de la surface, et les larves de *Culex* la tête en bas, dans une position oblique ou verticale. Dans l'un et l'autre cas, les orifices de la respiration restent en contact avec l'air.

Les nymphes (fig. 4) des Culicidés vivent dans l'eau comme les larves : avec leur queue étroite et leur volumineux thorax non séparé de la tête, elles ressemblent quelque peu à

Fig. 4. — Nymphe d'*Anopheles maculipennis* Meig. Sur la partie dorsale du céphalothorax renflé, les deux tubes respiratoires dilatés en trompes. D'après Théobald.



des têtards. Ces nymphes respirent au moyen de tubes situés sur la partie dorsale de la région thoracique (fig. 4) ; elles sont d'ailleurs mobiles, ce qui est peu fréquent chez les Diptères, et, par des saccades assez brusques, peuvent descendre vers le fond. L'éclosion de l'adulte s'effectue à la surface.

Les femelles des Culicidés sont pour la plupart vulnérantes, et s'attaquent d'ordinaire aux Vertébrés à sang chaud. C'est vers le soir et durant la nuit qu'elles se livrent à la recherche

de leurs victimes, mais il est aussi des espèces qui piquent à toute heure.

La lumière les attire dans les habitations, qu'ils désertent souvent pendant le jour. Au repos (fig. 5), ils se tiennent immobiles dans les recoins ou sur les parois de teinte sombre; il est alors facile de les capturer.



Fig. 5. — *Culex* et *Anopheles* au repos; à gauche un *Culex* avec l'abdomen un peu incliné vers le support et la trompe formant un angle avec l'axe du corps; dans l'*Anopheles* (à droite), l'abdomen se relève (parfois presque verticalement) et la trompe est dans le prolongement de l'axe du corps. D'après Théobald.

2° *Simuliidés* (*Black-flies* et *Buffalo-gnats* des Anglais; *Mouka-fohi* des Malgaches). — Tandis que la famille des Culicidés compte de nombreux genres et plus de 400 espèces, celle des Simuliidés se réduit au seul genre *Simulium* dont le nombre des types spécifiques connus ne dépasse guère 60. Au surplus, on peut trouver partout, et parfois en grande abondance, des représentants de ces deux familles.

Les Simulies (fig. 6) atteignent au plus 4 millimètres de longueur; leur corps est trapu, surtout dans la région du thorax, leurs antennes sont droites et courtes, leurs pattes peu allongées et leurs ailes fort larges: leur appareil buccal proémine peu, étant plutôt fait pour mordre que pour piquer. Les mâles ne sont pas vulnérants, encore que leur appareil buccal diffère

assez peu de celui des femelles; ils se distinguent de ces dernières par leurs yeux volumineux qui se touchent sur le vertex de la tête.



Fig. 6. — *Simulium invenustum* Walk., des États-Unis. Femelle vue de côté. D'après Riley.



Fig. 7. — Un groupe de larves de *Simulie* fixées sur une pierre. Gross. 3/4. D'après Miall.

Ces Insectes se trouvent surtout au voisinage des eaux courantes. C'est sur le bord de ces eaux que les femelles déposent leurs œufs, et c'est sur les corps immergés que vivent et se développent les larves. Ces dernières sont à peu près cylindriques, fixées sur leur support par une ventouse terminale et munies à l'autre bout d'un double éventail très mobile (fig. 7). Après leur évolution, qui dure plus d'un mois, elles se filent un cocon à la même place, et, au sein de cette enveloppe, se transforment en nymphe immobile. Au bout d'une semaine, l'enveloppe nymphale s'entr'ouvre et l'adulte monte à la surface, entraîné par une bulle d'air.

Tandis que la plupart des Culicidés (mais non pas tous) traversent la mauvaise saison à l'état adulte, les Simuliidés hivernent à l'état larvaire. Ces moucherons s'attaquent à leurs victimes durant le jour; comme leur appareil buccal est court, ils recherchent les parties dépourvues de poils et, chez l'Homme, mordent surtout les paupières et la cornée.

3° *Autres Némocères vulnérants.* — Les *Ceratopogon* (famille des Chironomidés) et plusieurs Psychodidés ne sont pas moins vulnérants que les Cousins, avec lesquels, d'ailleurs, ils

présentent une certaine ressemblance. Ce sont de fort petits moucheron qui atteignent 2 ou 3 millimètres de longueur. Ils se trouvent au voisinage des eaux ou des lieux humides.

BRACHYCÈRES PIQUEURS ET SUCEURS. — Les Brachycères vulnérants sont, en général, de formes plus robustes et de dimensions plus grandes que les Némocères; ils ont pour représentants les *Tabanidés*, quelques *Muscidés* et les *Hippoboscidés* ou *Pupipares*.

1^o Tabanidés. — Les *Tabanidés* ou *Taons* forment une famille des plus riches où l'on compte de nombreux genres et près de 1,600 espèces; ils sont répandus partout, principalement au voisinage des lieux fréquentés par les grands Mammifères herbivores, sauvages ou domestiques.

Ces mouches ne présentent jamais de dimensions très réduites; une des plus petites est notre *Chrysops aveuglant* (*Chrysops cæcutiens*, fig. 8) qui mesure environ 7 millimètres de longueur, et les plus grandes ne dépassent guère notre *Taon du Bœuf* (*Tabanus bovinus*, fig. 9) qui peut atteindre près de 30 millimètres.



Fig. 8. — *Chrysops cæcutiens* L., petit Tabanide européen; femelle.



Fig. 9. — *Tabanus bovinus* L., Taon européen de grande taille; femelle.

Les *Tabanidés* se reconnaissent à leurs formes un peu lourdes, à leur corps sensiblement déprimé, à leur tête convexe en avant et un peu concave en arrière, à leurs yeux énormes qui montrent des reflets irisés, à leurs ailes un peu écartées en arrière pendant le repos.

Ils présentent souvent des taches ou des bandes sombres

(fig. 8) sur ces dernières, et leur troisième article antennaire conserve à son extrémité libre les restes d'une segmentation. Leur trompe est de coutume dirigée vers le bas, recouverte en avant par les gros palpes maxillaires ; chez certaines *Pangonia* (fig. 10), elle devient fort longue et alors fait saillie en avant. Les yeux des mâles sont contigus sur le vertex comme dans les *Simulies* de même sexe ; ceux des femelles sont séparés par une bande étroite, à bords presque parallèles.



Fig. 10. — *Pangonia crassipalpis*
Macq., espèce de la Colonie du Cap.



Fig. 11. — Larve de *Tabanus cordiger*
Meig, un peu grossie. D'après Brauer.

Les œufs sont déposés en masse sur les plantes ou dans les débris végétaux ; ils donnent naissance à des larves longues et fusiformes, souvent ornées de verrues (fig. 11) en divers points de leurs anneaux. Ces larves carnivores ou omnivores vivent dans le sol, dans les détritux, ou dans l'eau ; elles se transforment en nymphes longuement ovoïdes et immobiles qui se tiennent dans les mêmes milieux.

Les Tabanidés femelles poursuivent l'homme et les grands Mammifères durant la journée, surtout quand il fait très chaud. Les mâles se contentent de butiner sur les fleurs.

2^e *Muscidés*. — Les Muscidés ou vraies Mouches forment une immense famille où, fort heureusement, les espèces vul-

néerantes sont peu nombreuses. Ces dernières se limitent essentiellement aux *Stomoxes* ou *Mouches charbonneuses*, aux *Glossines* ou *tsé-tsé*, et à quelques rares espèces réparties dans trois autres genres : *Hæmatobia* (fig. 1), avec 2 espèces européennes, *Beccarimyia* avec une espèce trouvée à Massouah, *Lyperosia* avec une espèce répandue en Europe et dans l'Amérique du Nord, et une seconde signalée dans le pays des Somalis et à Ceylan.

Tous ces Muscidés ressemblent beaucoup à notre Mouche domestique, mais certains sont un peu plus petits (*Lyperosia*), d'autres légèrement plus grands (*Glossina*). Ils se distinguent par la présence d'une longue trompe vulnérante dirigée suivant l'axe du corps quand l'insecte est au repos, verticalement quand il est en train de piquer.

Les *Stomoxes* (fig. 12) sont répandus partout et représentés par peu d'espèces. Ils ressemblent à la Mouche commune par leur taille, leur coloration et leur développement. Leurs larves et leurs pupes se trouvent dans le fumier, où ils déposent leurs



Fig. 12. — *Stomoxys*
du Natal, femelle
au repos. Gross. 3/1
D'après Austen.



Fig. 13. — *Glossina longipennis* Corti,
femelle au repos. Gross. 3/1. D'après
Austen.

œufs; les premières sont des *asticots* blanchâtres; les secondes occupent le centre d'un tonnelet brunâtre formé par la peau

durci de la larve. Notre *Stomoxys calcitrans* pond dans le fumier de Cheval; aussi est-il commun au voisinage des écuries. Comme les autres Stomoxes, il s'attaque à l'Homme et aux Mammifères domestiques.



Fig. 14. — Pupa de Glossine, avec les deux tubercules de l'extrémité postérieure. Gross. 9/1. D'après Austen.

Il en est de même des *Glossina* ou *tsé-tsé* (fig. 13), dont on connaît 8 espèces localisées dans l'Afrique tropicale. Ces Mouches se distinguent des autres Muscides : 1° par la position de leurs ailes qui, au lieu d'être écartées en arrière durant le repos, s'appliquent étroitement l'une sur l'autre ; 2° par la propriété que possède la femelle de donner naissance à des larves qui ont achevé leur croissance. Ces dernières se transforment presque aussitôt en pupes brunâtres (fig. 14), qui présentent en arrière 2 saillies séparées par une dépression assez profonde.

La mouche se localise en certains points, au voisinage des cours d'eau ; elle pique durant les heures chaudes du jour et, comme les femelles de Simulies, se gonfle tellement de sang qu'elle ne peut plus voler.

Hippoboscides. — Des Glossines nous passons naturellement



Fig. 15. — *Hippobosca equina* L., un Pupipare européen; femelle.



Fig. 16. — Le Méléphage du Mouton (*Melophagus ovinus* L.); un Pupipare européen dépourvu d'ailes; femelle.

aux Hippoboscides, appelés aussi *Pupipares* à cause de la pro-

priété qu'ont les femelles de produire des larves qui se transforment en pupes au moment de la naissance.

Les Hippoboscidés ont des formes lourdes, une tête peu épaisse et souvent rétractile contre le thorax, un abdomen où la segmentation s'atténue, des téguments élastiques, et de fortes griffes au bout des pattes. Ils volent peu et mal, et souvent même sont dépourvus d'ailes. Les *Hippobosques* (fig. 15) attaquent les Chevaux, les Ruminants et les Chiens; les *Ornithomyia* vivent aux dépens des Oiseaux; les uns et les autres ressemblent à des Mouches déprimées et présentent encore des ailes qui, au repos, s'appliquent l'une sur l'autre comme celles des Glossines. Les *Lipoptena* vivent aux dépens des Cervidés, et perdent rapidement leurs ailes; ils ne dépassent guère 3 millimètres (Europe. Amérique du Nord, Malacca). Les *Mélophages* sont représentés par une seule espèce, le *Melophagus ovinus* (fig. 16), qui est toujours aptère et se tient dans la toison des Moutons.

III

RÉCOLTE ET CONSERVATION

A cause de leurs téguments fort minces, de leurs poils et de leurs fines écailles, les Diptères sont d'une délicatesse et souvent d'une fragilité extrêmes. Aussi leur récolte et leur conservation exigent-elles des soins que, d'ordinaire, ne réclament pas les autres insectes.

CAPTURE. -- Le matériel nécessaire à la capture comprend des *filets à papillon* ordinaires, des *tubes à bouchon de liège*, et un ou plusieurs *flacons à cyanure*. Ces derniers seront médiocrement volumineux et aplatis de façon à pouvoir facilement être mis en poche; les tubes auront des calibres variés, en rapport avec la taille des insectes.

Les Diptères se capturent au vol ou durant le repos.

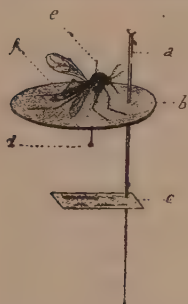
Pour chasser les Diptères *au vol*, on se sert du filet à papillon. Le maniement de cet appareil réclame de l'habitude et certains coups de main qui, d'ailleurs, s'acquièrent très vite.

Les insectes étant au fond du filet, on les fait passer dans un tube ou dans un flacon de cyanure que l'on ferme ensuite avec le bouchon.

Quand ils sont *au repos* sur le feuillage, les Diptères se capturent également à l'aide du filet. Sur une surface plane et résistante, on peut les capturer directement avec le tube ou le flacon à cyanure, dont on applique l'orifice de manière à emprisonner l'insecte. Si ce dernier reste immobile, on le chasse dans l'intérieur du tube ou du flacon en glissant contre la vitre une feuille de papier, ou en insufflant de la fumée de tabac sous le bord légèrement relevé.

Il convient de ne tuer les Diptères qu'au moment de les préparer, cela est nécessaire pour qu'ils conservent toute leur souplesse. Doit-on rester longtemps en route, il faut dès lors conserver les Insectes vivants dans les tubes de chasse et ne les tuer au cyanure qu'arrivé à domicile. Est-on au contraire sur le lieu même où doit se faire la préparation, il y a lieu de se servir directement du flacon à cyanure.

Dans les cas d'absolue nécessité, on peut chasser au loin



avec ce dernier flacon, d'ailleurs occupé par des fragments de papier froissé qui s'opposent au déplacement des cadavres. Mais ce procédé a des inconvénients, car un long séjour dans les flacons cyanurés altère toujours un peu les insectes.

MATÉRIEL DE PRÉPARATION. — Le matériel nécessaire à la préparation des Diptères comprendra les pièces suivantes :

1° Des *pincettes entomologiques* (à bout recourbé) pour la fixation des épingles ordinaires ;

2° Des *pincettes mordantes* pour la fixation des fines épingles appelées *micros* ;

3° Des *épingles entomologiques ordinaires* (fig. 17, *a*), pour les grosses espèces ;

4° Des *micros* ou épingles fines et courtes (fig. 17, *d*, *e*), pour les petites espèces (épingles n° 20) ;

Fig. 17. — Préparation définitive d'un moustique : *b* disque de bristol (remplaçable par un rectangle) ; *d* et *e* tête et pointe de la fine épingle ou *micro* qui traverse le thorax de l'insecte *f* ; *a* grosse épingle qu'on fixe au liège d'une boîte après l'avoir munie d'une étiquette *c*. D'après Théobald.

5° Des aiguilles à dissection;

6° Pour la fixation des petits Diptères, des *boîtes à fond de liège*, grandes comme un in-12, et peu profondes;

7° Pour les grosses espèces, des *boîtes entomologiques ordinaires*;

8° Des fragments de *tubes de verre* (tubes barométriques) de divers calibres pour isoler ou emprisonner les insectes qu'on ne pourrait fixer;

9° Des *flacons* ou des *tubes* pour les animaux conservés en liquide;

10° Du bristol et une paire de ciseaux pour le découper;

11° Une provision d'ouate hydrophile;

12° Quelques plaques de liège pour le piquage des insectes.

Il faut rejeter les *boîtes à fond de moelle*, car les épingles, d'ordinaire, y sont très vite oxydées.

PRÉPARATION. — Il suffit de 5 à 10 minutes pour tuer les insectes dans le flacon à cyanure; sauf le cas d'absolue nécessité, les cadavres sont ensuite retirés du flacon et immédiatement préparés.

Suivant l'habileté du chasseur, ou les conditions dans lesquelles il se trouve, la préparation pourra être plus ou moins parfaite. Il convient d'examiner ces divers cas, dans l'ordre de leur perfection décroissante :

1° *Préparation définitive*. — S'agit-il de Diptères gros ou médiocres, on les pique vers le milieu du thorax avec une épingle appropriée et on étale convenablement leurs ailes et leurs pattes. On fixe *solidement* l'épingle sur le fond d'une boîte entomologique, avec une étiquette où sont inscrits la date, le lieu de la capture et les autres observations utiles.

S'agit-il au contraire de petits moucheron, tels que des *Culicidés* ou des *Simulies*, on commence (fig. 17) par découper un petit rectangle ou un disque de bristol (*b*), dans lequel, avec une aiguille, on amorce une perforation quelque peu excentrique; puis on enfonce une micro (*d*) dans le bristol au point où se trouve la perforation ébauchée. L'insecte étant renversé sur une lame de liège, on le pique avec la micro munie de son bristol, la pointe (*e*) devant traverser le thorax de la face ventrale au côté dorsal, et dépasser celui-ci d'une faible longueur.

Les ailes et les pattes étant arrangées ensuite avec l'aiguille à dissection, une épingle (*a*) est enfoncée dans le bristol derrière l'insecte, puis munie d'une étiquette (*c*) et implantée solidement sur le fond liéé d'une boîte.

Cette méthode réclame quelque habileté, mais *elle est, de beaucoup, préférable à toutes les autres*. Il sera toujours facile de l'employer avec les Mouches et les Tabanidés.

2° *Préparation plus rapide mais moins parfaite*. — Piquer chaque insecte tel qu'il sort du flacon à cyanure, sur le dos du thorax si c'est possible, sur le flanc ou de toute autre manière si l'insecte, en raison de sa petite taille, ne se prête pas à la manipulation précédente. Les insectes piqués avec des épingles entomologiques ordinaires sont rangés dans une boîte entomologique, ceux préparés aux micros sont fixés sur le fond de liège d'une petite boîte. (*Toujours avec des étiquettes de capture.*)

3° *Conservation en tubes ou avec des couches d'ouate*. — Est-il impossible de se livrer à l'une ou l'autre des préparations précédentes, on recourra aux tubes de verre. On ferme une extrémité de ces tubes avec un tampon serré d'ouate hydrophile, et l'on fait tomber les insectes fraîchement tués sur ce coussinet de fermeture. Puis un autre tampon semblable est poussé jusqu'au contact des cadavres, formant un second coussinet qui recevra un second lot¹. Et ainsi de suite, les tampons divisant le tube en un certain nombre de compartiments où les insectes sont bien protégés. Chaque lot doit être accompagné d'une étiquette. Cette méthode convient à toutes les espèces, grandes ou petites. Il s'en faut qu'elle offre les avantages des précédentes, surtout avec les Culicidés; mais, faute de mieux, il est bon de l'employer, car elle est commode et rapide.

Pour les grosses espèces, on peut se contenter de la méthode entomologique courante qui consiste à disposer dans une *boîte en bois* (boîte à cigares, etc.) ou *en carton*² des couches successives d'ouates et d'insectes, ces derniers étant bien posés sur les couches d'ouate et éloignés les uns des autres. — Pour les

1. Il est préférable d'employer des tubes courts, ne recevant qu'un lot ou deux; on en retire plus aisément les insectes.

2. Les boîtes métalliques sont très mauvaises, car elles favorisent la putréfaction et le développement des moisissures.

petites espèces, et surtout pour celles à pattes longues, ce procédé est de beaucoup le plus défectueux; mais on peut alors mettre les insectes dans des papillotes préparées de la manière suivante : on découpe du papier en carrés, on replie chaque carré sur lui-même suivant une diagonale et au fond du triangle double ainsi formé on dispose avec soin un insecte; on transforme ensuite le triangle en enveloppe close en repliant marginalement ses deux bords latéraux. Il suffit d'empiler ces enveloppes dans une boîte, sans les serrer trop étroitement. Cette méthode est empruntée aux chasseurs de Papillons.

OBSERVATION IMPORTANTE. — Pour les besoins de l'étude et pour faciliter les recherches relatives à la classification des Diptères, il conviendra de diviser en deux parts les insectes d'une même espèce : les uns seront préparés à sec suivant les méthodes précédentes, les autres conservés dans l'alcool à 90° ou dans une solution de formol à 4 0/0.

Les larves et les nymphes doivent toujours être conservées dans l'un ou l'autre de ces liquides¹.

CONSERVATION, EXPÉDITION. — Les insectes conservés en milieu liquide abandonnent assez rapidement une certaine quantité d'eau qui altère plus ou moins l'élément conservateur; aussi convient-il de remplacer ce dernier après un ou deux jours, en ayant soin de ne pas mettre trop d'individus dans un même flacon. Il suffit ensuite de surveiller le bouchage, qui doit être hermétique.

Les collections sèches réclament d'autres soins, car elles peuvent être envahies par les insectes destructeurs et par les moisissures. On préviendra ce double danger en plaçant les boîtes et les tubes dans un récipient clos richement pourvu de naphthaline. Que cette dernière soit en poudre ou en cristaux, il ne faut pas la placer dans les boîtes, où elle pourrait, au moindre mouvement, détériorer les insectes.

L'expédition des tubes ou des flacons qui renferment des insectes en milieu humide ne réclame pas d'autres soins qu'un emballage bien fait. Pour les collections sèches, ce dernier réclame des soins spéciaux, les boîtes devant être bien séparées

1. On conserve aussi dans ces liquides les autres Articulés vulnérants : Ixodes ou tiques, Puces, Poux, Punaises.

les unes des autres avec une couche épaisse de matières isolantes (foin, copeaux, étoupes, etc.) saupoudrées de naphthaline.

Nota. — Le laboratoire d'entomologie du Muséum, le laboratoire colonial du même établissement, et l'Institut Pasteur de Paris conservent un matériel type et pour la capture et la conservation des Diptères.

Culture du Trypanosome de la grenouille

(*Trypanosoma rotatorium*)

PAR LE Dr G. BOUET

Médecin-major des troupes coloniales.

Avec la planche XXVI.

(Travail du laboratoire de M. Mesnil.)

En 1842, Gluge a découvert chez les grenouilles un trypanosome; Mayer le revit l'année suivante et, la même année, Gruby créa pour lui le nom de genre *Trypanosoma*; son nom spécifique est *Trypanosoma rotatorium* (Mayer 1843). Il a été, depuis, revu par un grand nombre d'auteurs; mais c'est Ziemann qui le premier, en 1898, a pu en colorer le centrosome et le noyau, à l'aide d'une modification de la méthode de Romanowsky. En 1901, Laveran et Mesnil reprennent ces études et arrivent à le colorer nettement et à mettre en évidence tous les détails de sa structure ¹.

Désirant essayer de cultiver ce Flagellé, nous avons été amené à le rechercher chez les grenouilles (*Rana esculenta*), et voici ce que nous avons constaté.

Sur un lot de 20 grenouilles, apportées en mai 1905, nous en trouvons 6 d'infectées, soit une proportion de 30 0/0. Il est possible cependant que quelques-unes de nos grenouilles aient renfermé des parasites qui ont échappé à notre examen. En général, en effet, le nombre des trypanosomes est très faible et souvent à l'état frais, entre lame et lamelle, on n'en trouve qu'un ou deux dans toute la préparation. Du reste, il nous est arrivé, dans le lot de grenouilles non parasitées, que nous avons séparé des grenouilles atteintes, de trouver des parasites chez l'une d'elles à un examen ultérieur. Il est probable qu'au premier examen ils étaient passés inaperçus, car il est difficile d'admettre la contamination en aquarium.

1. Pour la bibliographie, voir LAVÉLAN et MESNIL, *Trypanosomes et Trypanosomiasés*, Paris 1904, p. 365 et suivantes.

En octobre 1905, un lot de 25 grenouilles ne nous a donné qu'un très petit nombre de Batraciens parasités : 3 seulement en effet furent trouvés porteurs de *T. rotatorium*. Il semble donc qu'à Paris tout au moins, les parasites se rencontrent moins fréquemment en hiver, ce qui est en contradiction avec l'opinion de Koninsky ¹.

Dans les deux lots, nous avons rencontré des grenouilles triparasitées par : a) *Hæmogregarina ranarum* (Ray Lankester 1882); b) une filaire; c) *Trypanosoma rotatorium*; — d'autres n'avaient que deux parasites : ou hémogrégarine et trypanosome, ou trypanosome et filaire; d'autres enfin un seul, soit trypanosome, soit hémogrégarine, soit filaire.

Un petit nombre de crapauds ont été également l'objet de notre examen : 1° *Bufo calamita*; 2° *Pelobates fuscus*; 3° *Bufo vulgaris*. Aucun ne renfermait de parasites.

MORPHOLOGIE DU « TRYPANOSOMA ROTATORIUM » CHEZ LA GRENOUILLE.

Les formes du parasite que nous avons rencontrées sont celles décrites par Laveran et Mesnil (*loco citato*); en particulier les formes trapues (fig. I, 1) et minces, (fig. I, 2) toutes deux pouvant être du type pectiné. Les premières, cependant, ont été plus fréquentes. On sait que Chalachnikov, collaborateur de Danilewsky, a voulu faire une classification de ces diverses formes, et il en a reconnu jusqu'à 5.

Etant donné le pléomorphisme de ce trypanosome, il est possible que toutes les transitions entre la forme trapue et la forme mince puissent être rencontrées. Nous devons dire cependant qu'en général, nous n'avons vu, chez un même batracien, que l'une ou l'autre.

Pour les cultures, nous avonsensemencé les deux formes et les résultats ont été identiques.

Il nous paraît nécessaire, pour établir la comparaison entre la forme du trypanosome dans le sang et les formes qu'on obtient en culture, de rappeler rapidement ici les caractères principaux du parasite dans le sang de la grenouille.

A l'état frais, entre lame et lamelle, c'est une masse protoplasmique dont les mouvements sont de deux sortes : mouve-

1. KONINSKY, *Biolog. Centralbl.*, t. XXI, 1901, p. 40

ments du flagelle d'une part et mouvements amiboïdes d'autre part.

Les mouvements amiboïdes seuls permettent le déplacement



Fig. I. — 1, 2. *Trypanosoma rotatorium* dans le sang de la grenouille; — 3-6, Le même dans les cultures. — Grossissement 1,600 D. environ.

total du corps de l'animal, déplacement du reste très lent et de peu d'étendue. Quand l'animal met son flagelle en mouvement, le corps reste en général immobile ou tourne sur lui-même. Les ondulations du flagelle sont de durée inégale avec des intervalles de repos. Le noyau et le centrosome se distinguent très difficilement à l'état frais.

La coloration du *T. rotatorium* se fait facilement sur lame de sang étalée, et la méthode que nous avons employée est celle de Giemsa.

La fixation obtenue à l'aide de l'alcool absolu pendant 10 minutes, on fait agir pendant 1/4 d'heure à 1/2 heure la solution dans les proportions suivantes :

Eau.....	40 c. c.
Solution de Giemsa.....	1 c. c.

Le mélange doit être fait extemporanément au moment de s'en servir. C'est, du reste, la même formule que nous employons pour tous les trypanosomes. Les lames sont placées dans une boîte de Laveran-Mesnil, le frottis en dessous, de façon à éviter

le dépôt de précipités qui se forment toujours un peu. Nous nous servons ou non de l'essence de girofle, selon que la préparation a été plus ou moins surcolorée.

Nous avons employé également, mais principalement pour les cultures, la fixation aux vapeurs d'acide osmique. Nous y reviendrons plus tard.

La membrane ondulante se colore en lilas, et son bord épaissi se détache très nettement. Son extrémité libre se termine par un flagelle de même nature cytologique. L'autre extrémité (extrémité postérieure) vient aboutir à un centrosome situé ou non au milieu d'une vacuole à contours assez nettement définis. Ce centrosome, dans les formes minces, est assez près du noyau, mais toujours vers l'extrémité postérieure du corps de l'animal, le flagelle représentant l'extrémité antérieure. Dans les formes trapues, au contraire, le centrosome est situé indistinctement près du noyau, soit à droite, soit à gauche, et plus rarement dans la partie postérieure; nous ne l'avons jamais vu dans la partie antérieure.

Le centrosome se colore comme la membrane et le flagelle, mais plus fortement. Le noyau ne présente aucune particularité de coloration. Il est coloré en rouge foncé par le Giemsa. Le protoplasme se colore en bleu foncé et on distingue très facilement, dans les bonnes préparations, les plissements du corps.

Nous n'avons pas rencontré, dans le protoplasme, de granulations rondes ne se colorant pas, comme en ont vu Laveran et Mesnil. Nous verrons plus loin qu'on retrouve de ces grains dans certaines formes culturales.

Nous n'avons pas vu de formes de multiplication de *T. rotatorium* dans le sang ni de très jeunes parasites.

Le phénomène de l'agglutination des parasites dans le sang, par l'addition de sérum de grenouilles ayant eu l'infection trypanosomique, nous semble difficile à réaliser. Le nombre des trypanosomes est toujours très restreint d'une part et, d'autre part, ces parasites sont si lents dans leurs mouvements qu'il semble difficile qu'ils puissent facilement s'agglutiner. Nous n'avons pu l'essayer, n'ayant pas rencontré de grenouilles très infectées.

CULTURES

Nous venions de commencer nos essais de culture, quand nous parvint le mémoire de Lewis et Williams¹.

Ces auteurs se sont servis de gélose nutritive, à l'eau de condensation de laquelle ils ajoutaient 2-3 gouttes de sang de grenouille ou de crapaud.

Avec le sang de 2 grenouilles infectées de trypanosomes, Lewis et Williams ont obtenu au bout de 15 jours des Flagellés, jamais abondants, dont les plus gros avaient $18\ \mu$ sur $2\ \mu$, un long flagelle s'insérant à un centrosome situé à l'extrémité antérieure et un rudiment de membrane ondulante. Un seul réensemencement a réussi. Les auteurs ne donnent pas d'autres détails et ne figurent pas leurs formes de culture.

La difficulté, d'une part de se procurer une quantité de sang suffisante avec des Batraciens, d'autre part, la possibilité, comme cela est arrivé aux auteurs américains, d'ensemencer, avec le sang, des trypanosomes qui s'y trouvaient contenus et de voir dans un tube qu'on croyait stérile se développer des cultures, nous ont fait rejeter cette méthode. Nous étions d'ailleurs satisfait du milieu ordinaire de Novy et Mac Neal qui nous a donné d'excellents résultats.

Rappelons la formule du milieu de Novy et Mac Neal¹, auquel nous n'avons pas apporté de modifications essentielles.

Extrait de 125 gr. de bœuf dans l'eau distillée.....	1,000 grammes.
Gélose.....	20 —
Peptone.....	20 —
Sel marin.....	5 —
Sol. normale de Na^2CO_3	10 c.c.

A 1 volume du milieu gélosé, on ajoute 2 volumes de sang défibriné de lapin. Le milieu gélosé a été au préalable stérilisé et réparti dans des tubes.

Nous avons essayé quelques cultures avec un milieu dans lequel nous ajoutions une proportion différente soit de sang, soit de liqueur alcaline.

C'est ainsi que nous avons employé un mélange dont les

1. J. LEWIS et H. V. Williams (Univ. de Buffalo). The results of attempt to cultivate trypanosomes from frogs, *Soc. for experim. Biol. a. Med.*, séance du 15 fév. 1905, in *American Medicine*, t. IX, 25 mars, p. 491.

proportions étaient de 1 de gélose pour 1 de sang. Nous avons constaté qu'avec la formule de Novy et Mac Neal, nous obtenions d'excellents résultats. Les cultures poussaient plus rapidement et plus abondamment. Avec la 2^e formule, nous n'avions que des cultures maigres, sans vitalité, où rapidement les trypanosomes disparaissent après avoir présenté de nombreuses granulations dans le protoplasme.

La solution normale de carbonate de soude est de 53 grammes pour 1,000 grammes d'eau distillée. Nous avons essayé une solution renfermant 106 grammes de sel pour 1,000 grammes. L'adjonction de cette solution deux fois plus alcaline ne donne également que de mauvaises cultures, poussant beaucoup plus lentement et mourant en quelques jours.

L'addition du sang défibriné de lapin se fait à la température de 50°. La gélose, liquéfiée à sa température de fusion, est mise à refroidir jusqu'à ce qu'on ait obtenu cette température.

Les tubes remplis de 2 p. de sang pour 1 de gélose sont inclinés et laissés un jour à la température du laboratoire, puis mis 24 heures à l'étuve à 37°. On peut alors les redresser et les conserver au laboratoire jusqu'au moment de s'en servir.

L'ensemencement se fait avec du sang de grenouille infectée. Les auteurs américains avaient insisté sur la difficulté de prélever ce sang aseptiquement. Cette difficulté semble facilement résolue en opérant comme il suit. Nous passons au fer rougi l'abdomen de la grenouille fixée sur une planchette de liège et, après avoir écarté la peau et coupé aux ciseaux fins les plans musculaires et le sternum, nous dégageons le cœur que nous brûlons légèrement au fer. Une pipette fine stérilisée est alors introduite dans le cœur et on prélève ainsi la quantité de sang que l'on désire pour l'ensemencement. Pour les premières cultures, nous avons ensemencé une assez grande quantité de sang, soit de 10 à 20 gouttes par tube, le nombre des trypanosomes y étant toujours faible.

Ce n'est que pour les passages, alors que les trypanosomes étaient nombreux dans les cultures, que nous nous sommes servis de l'œse.

1. WARD J. MAC NEAL, The life history of *Trypanosoma Lewisi* a. *T. Brucei*: *Journal of inf. diseases*, nov. 1904.

Comme pour les autres trypanosomes, c'est dans le liquide de condensation que nous ensemençons. Au début de nos recherches, nous mettions les cultures à l'étuve à 22°, mais nous nous sommes aperçu qu'elles n'y poussaient pas d'une façon plus rapide qu'à la température du laboratoire. C'est en somme la température que le trypanosome rencontre dans le sang de la grenouille.

Un séjour de 50 heures à l'étuve à 37° a fortement altéré un tube de culture; la plupart des trypanosomes sont tués, et ceux qui sont encore vivants n'ont plus que des mouvements du flagelle. Au bout de 24 heures, la culture examinée était encore parfaitement vivante. Soumis à une température de 55°, les trypanosomes sont tués en moins d'un quart d'heure.

Un tube de culture mis à la glacière ou dans la glace fondante a encore des trypanosomes vivants au bout de 8 jours. Mais il semble qu'il n'y a plus multiplication; la culture s'arrête.

Avec le milieu à 1 de gélose pour 2 de sang (Novy), nous avons obtenu des premières cultures au bout de 4 à 5 jours. Au contraire avec 1 de gélose et 1 de sang, les cultures ont été beaucoup plus lentes; elles n'ont poussé qu'en 16 à 20 jours. Comme on le voit, ce dernier milieu convenait peu aux trypanosomes qui s'y habituent difficilement et y meurent assez rapidement. Enfin un certain nombre de cultures sont restées stériles, quelques-unes ont été contaminées par un petit coccus à mobilité brownienne très nette.

Nous avons dit plus haut que les deux formes, trapue et mince, nous ont donné des cultures positives.

La plupart des grenouilles dont nous avons ensemencé le sang renfermaient, en dehors des *T. rotatorium*, d'autres parasites (filaires, hémogregarines). Une grenouille ne renfermant que des Tryp. nous a donné des résultats positifs.

Enfin nous avons ensemencé du sang de grenouille ne renfermant que des hémogregarines sans obtenir de résultats.

Au moment où nous écrivons ce mémoire, nous avons réalisé 10 passages successifs par réensemencement, soit avec l'œse, soit avec 5 à 6 gouttes de culture prélevées à la pipette.

Dans les tubes de réensemencement, les trypanosomes appa-

raissent au bout de temps très variables, depuis 3 jours jusqu'à 25 et même 34 jours. Le temps moyen a été de 6 à 10 jours avec le milieu type Novy. C'est du 18^e au 25^e jour que les trypanosomes sont les plus nombreux dans les cultures. Cette abondance persiste dans certaines cultures de 30 à 40 jours.

Dans les cultures jeunes, les jeunes trypanosomes peuvent s'agglutiner (fig. II, 19), mais c'est surtout vers la fin du premier mois que l'on observe, entre lame et lamelle, l'auto agglutination, toujours partielle du reste. C'est à ce moment que l'on peut observer un grand nombre de formes présentant des granulations très réfringentes, ne se colorant pas par le Giemsa.

Dans des cultures déjà vieilles (au 95^e jour pour l'une), nous avons observé des colonies en dehors de l'eau de condensation. Ces colonies très petites, de la dimension d'une tête d'épingle, réunies en amas, étaient situées sur la gélose à environ 1 centimètre du culot. Leur aspect nacré, opalescent, était de tous points semblable à celui des colonies qu'il nous a été donné d'observer avec une race de trypanosomes d'Oiseaux provenant de cultures de Novy et Mac Neal et envoyée par M. Novy à M. Mesnil. Mac Neal (*l.c.*) a déjà noté que des *Tr. lewisi* cultivés de tube en tube depuis plus d'une année, donnent des colonies sur gélose, humides, proéminentes et d'un blanc luisant. Thiroux¹ a vu que *T. duttoni* des souris au Sénégal donne des colonies d'aspect semblable. Les nôtres étaient moins abondantes que celles du *T. d'oiseau*.

Comme on le voit, la vitalité des cultures est très grande. Nous avons encore des trypanosomes vivants dans une 3^e culture au bout de 5 mois, mais c'est là un fait exceptionnel.

ETAT FRAIS (fig. II du texte). — A l'état frais, entre lame et lamelle, on rencontre de nombreuses formes de culture dont les plus communes se présentent sous l'aspect d'une masse fusiforme, transparente, à protoplasma finement granuleux, munie d'un flagelle extrêmement mobile (fig. II, 1-9). On distingue très difficilement le noyau et le centrosome. Il y a cependant toujours une masse de protoplasme plus clair, à grains plus condensés, à position variable. Il est difficile, à l'état frais, de distinguer une membrane ondulante. Le flagelle, toujours très long,

1. THIROUX. *Annales de l'Institut Pasteur*. 1905.

nettement apparent, est animé de mouvements incessants.

Dès que le trypanosome se déplace (et il est très mobile), il se dirige le flagelle avant. Cet organe semble être pour lui un organe de tact, car dès qu'il a rencontré un obstacle, globule

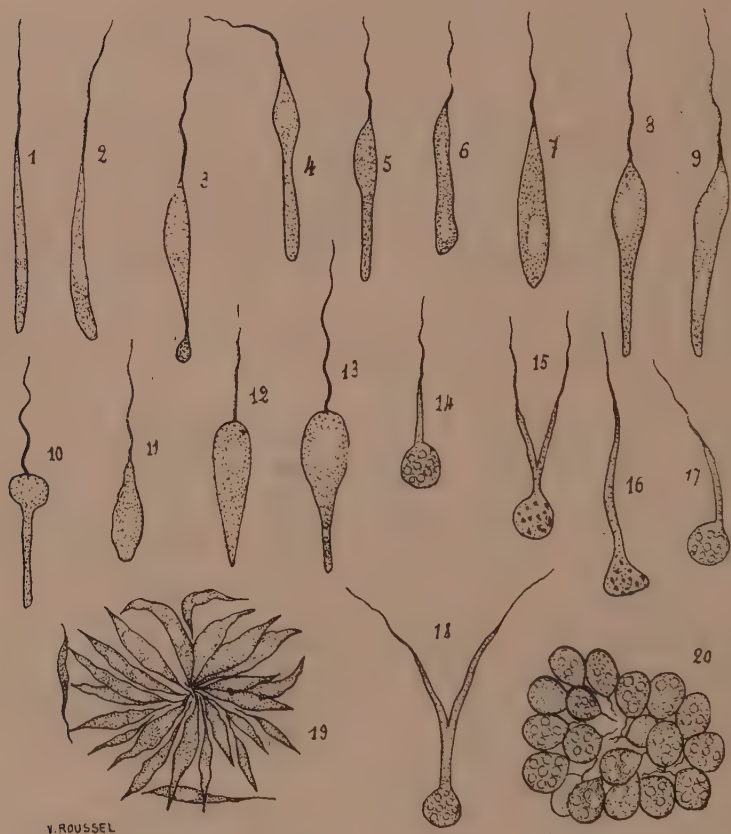


Fig. 11.—Aspect des trypanosomes dans les cultures (état frais). G., 1600 D. environ

sanguin du milieu ou un autre trypanosome, il s'arrête avant de repartir, ou au contraire s'agglutine avec le trypanosome qu'il vient de rencontrer. C'est, en général, par l'extrémité antérieure que se fait cette agglutination presque toujours temporaire.

En dehors de cette forme, de beaucoup la plus fréquente, on

peut rencontrer, surtout dans les premiers passages culturaux, tous les intermédiaires entre le trypanosome trapu de la grenouille et la forme que nous venons de décrire. C'est ainsi qu'on trouve des trypanosomes à forme massive, trapue, animés de mouvements beaucoup plus lents, rappelant la forme sanguicole.

Souvent aussi les trypanosomes affectent la forme vermiculaire qui peut passer, surtout dans les vieilles cultures, à la forme en hochet (fig. II, 10) ou en haltère.

Par transitions insensibles (fig. II, 11-13), nous arrivons (fig. II, 14-17) à des formes nettement rondes. Il semble qu'il y ait condensation du protoplasme du corps du protozoaire et que des matériaux de réserve s'y accumulent sous forme de granulations rondes, très réfringentes, qui ne se colorent pas dans les préparations.

Nous devons mentionner aussi le renflement du flagelle, assez fréquent et qui a déjà été observé avec d'autres trypanosomes en culture.

La multiplication se fait par division longitudinale, et il est fréquent de rencontrer des trypanosomes munis de deux flagelles (division par 2) et qui ne sont plus accolés l'un à l'autre que par leur extrémité postérieure. Nous avons vu la séparation se faire sous nos yeux (fig. II, 18).

Nous ne pensons pas, d'accord en cela avec Laveran et Mesnil, Thiroux, Novy et Mac Neal, que la multiplication normale se fasse par étranglement de corps sphériques, après formation d'haltères, comme l'avait pensé Danilewsky¹. Cependant nous avons observé la présence de deux flagelles dans les formes rondes, avec 2 noyaux et 2 centrosomes.

Les trypanosomes des colonies développées sur la gélose et non dans le culot, dont nous avons fait mention plus haut, offraient tous un aspect mûriforme. Le flagelle était très court, à peine mobile, et le protoplasme renfermait de petites sphères très réfringentes (voir fig. II, 20).

Comme Prowazek² et Thiroux³, nous pensons que c'est peut-

1. DANILEWSKY, *Nouvelles recherches sur les parasites du sang des Oiseaux*, Char'kov, 1889.

2. PROWAZEK, *Arch. a.d. Kais. Gesundheitsamte*, t. XX, f. 3, 1904, p. 440.

3. THIROUX, Recherches morphologiques et expérimentales sur *Trypanosoma padoe*, *Annales Institut Pasteur*, t. XX, fév. 1905.

être là le début du développement d'une forme de résistance des organismes en culture. Ce serait le prélude d'un enkystement analogue à celui des amibes dont le kyste offre une résistance presque indéfinie.

Les dimensions des trypanosomes en culture sont de beaucoup inférieures à celles du trypanosome normal de la grenouille. La comparaison des figures, 1-2 et 3-6 (v. page 565) en donnera une bonne idée. Voici celles que nous avons mesurées :

Formes fusiformes, longueur : $25\ \mu$ (flagelle compris), largeur : $2\ \mu$;

Formes rondes, diamètre : $5\ \mu$.

PRÉPARATIONS COLORÉES. — Après avoir essayé les diverses techniques proposées pour la coloration des cultures (fixation à l'alcool, puis méthode de Laveran ou de Giemsa), nous avons adopté la méthode suivante préconisée par Gray et Tulloch¹ pour les Flagellés du tube digestif des *Glossina palpalis*.

On étale en couche mince le liquide de culture sur les lames que l'on expose avant dessiccation aux vapeurs d'acide osmique. On « rafraîchit » la préparation pendant 5 à 6 minutes à l'aide de sérum normal d'un animal quelconque, puis on lave à l'eau. C'est alors seulement que l'on colore au Giemsa, par exemple, pendant $3/4$ d'heure ou 1 heure. On passe ensuite à l'essence de girofle pendant une minute, pour éclaircir la préparation.

C'est par cette méthode que nous avons obtenu les plus fines colorations qui nous ont permis de déceler la membrane ondulante de nos trypanosomes. La fixation par le Flemming nous a donné d'assez bons résultats.

Le corps des trypanosomes est coloré en bleu, mais les nombreuses granulations disséminées dans la masse restent incolores. Certaines parties du protoplasme, plus condensées, sont en bleu plus foncé. Le noyau est lilas clair ou violet lilas, et le centrosome violet très foncé.

Le noyau est situé, d'une façon générale, près de l'extrémité antérieure du corps, surtout dans les formes *Herpetomonas*, mais il peut être central ou même postérieur (pl. xxvi, fig. 4).

Le centrosome, parfois accolé au noyau et toujours très près de lui, est entre celui-ci et l'extrémité antérieure du corps. C'est

1. *Reports of the sleeping sickness commission*, n° VI.

du centrosome que part le flagelle. Comme on le voit, de latéral ou de postérieur chez les *T. rotatorium* du sang, le centrosome est devenu antérieur.

Dans une première culture, il nous a été possible de suivre la migration du centrosome. La figure 1 de la planche xxvi nous montre le centrosome postérieur; dans les figures 2, 3, 4 et 5 de la même culture, il est latéral ou nettement antérieur. De la forme trypanosome, nous sommes passés à la forme *Herpetomonas*.

Qu'est devenue la membrane ondulante dans cette migration centrosomique? A-t-elle, avec la forme *Herpetomonas*, définitivement disparu? Nous ne le croyons pas et il suffit de jeter un coup d'œil sur notre planche (v. fig. 6, 8, 10, 14, 27, 30) pour voir que presque tous nos trypanosomes possèdent une membrane ondulante dans les formes allongées, à centrosome antérieur (stade *Herpetomonas*).

Ces formes allongées, plus trapues, plus grandes aussi, sont pour nous des *formes adultes* et celles qui ne possèdent pas de membrane, toujours plus petites, piriformes ou fusiformes (v. fig. 12, 13, 15, 16), sont des formes jeunes chez lesquelles la membrane ondulante n'est pas encore développée.

Les formes rondes qui peuvent se rencontrer et dans les très jeunes cultures et dans les très vieilles, seraient, les unes de très jeunes trypanosomes en voie de développement, mais pouvant déjà se diviser (fig. 18 et 24), et les autres des formes d'involution devant plus tard aboutir à une morula et se transformer en un kyste (fig. 28 et 29). C'est alors que disparaît, chez ces formes âgées, la membrane ondulante et que le flagelle entre en régression, comme si le Protozoaire s'acheminait vers l'état de vie latente où ces organes lui deviendront inutiles (fig. 33-43).

La multiplication, nous l'avons vu plus haut, se fait par division longitudinale. Les préparations colorées permettent de déceler 2 noyaux, 2 centrosomes et 2 flagelles. La division du noyau semble précéder celle du centrosome (fig. 18 et 24), mais ce n'est pas une règle absolue.

AGGLUTINATION DANS LES CULTURES. — Nous avons vu plus haut que l'on observe l'autoagglutination dans les cultures entre lame et lamelle. A l'état frais, cette autoagglutination se présente sous

l'aspect que nous avons figuré dans la figure II du texte (19).

Comme on le voit, c'est par le flagelle que se fait l'agglutination, mais on peut rencontrer des trypanosomes agglutinés par leur extrémité postérieure.

Nous avons essayé de voir si le sérum du sang d'une grenouille trypanosomée possédait des propriétés agglutinatives vis-à-vis des trypanosomes des cultures. Très nettement, ce sérum a présenté des propriétés agglutinatives, alors que le sérum d'une grenouille non trypanosomée n'agglutinait pas nos cultures. Egalement aussi, nous avons fait agir du sérum d'un animal normal sans obtenir d'agglutination. Le sérum du sang d'une chèvre guérie de Nagana, était dépourvu de propriétés agglutinantes.

INOCULATIONS AUX BATRACIENS. — On peut admettre d'une façon générale que les grenouilles, apportées en été dans les laboratoires, sont parasitées par *T. rotatorium* dans une très large proportion (Laveran et Mesnil). Certaines chez lesquelles on ne peut trouver de trypanosomes, à l'examen microscopique, en renferment cependant (exp. de Lewis et Williams). Beaucoup aussi voient leurs parasites disparaître à un moment donné. Elles sont immunisées. Dans ces conditions, il devient difficile de reproduire expérimentalement, chez la grenouille, l'infection naturelle. Il nous eût fallu élever *ab ovo* de jeunes têtards. Le temps nous a manqué.

Malgré cela, nous avons expérimenté sur 6 grenouilles, chez lesquelles l'examen fréquent du sang ne nous avait jamais décelé la présence de *T. rotatorium*. Nous avons injecté, dans le péritoine de ces 6 grenouilles, jusqu'à 1/2 c. c. de culture du 1^{er} ou du 7^e passage. Des essais de réinfection ont été faits et nous n'avons jamais obtenu de résultats positifs.

La forme que revêt sans doute dans le corps de l'hôte intermédiaire (sangsue probablement) le *T. rotatorium*, s'éloigne-t-elle de notre trypanosome de culture? Nous ne savons, toujours est-il que nos essais ont toujours été infructueux.

Nous avons également inoculé, à des *Bufo* et à des *Pelobates*, des trypanosomes de nos cultures, sans obtenir plus de succès. Nous le regrettons. Nous eussions ainsi fermé le cycle que de plus heureux que nous ont obtenu avec d'autres trypanosomes de culture.

EXPLICATION DE LA PLANCHE

Tous les dessins de cette planche ont été faits d'après des préparations de Trypanosomes de cultures, colorées par la méthode à l'acide osmique — sérum exposé ci-dessus. Les contours des figures ont été dessinés à la chambre claire de Dumaige, microscope Stiasnie, oculaire 6, objectif Imm. hom. 4/15. Le grossissement figuré sur la planche est d'environ 1,800 diamètres. Pour les détails, voir le texte.

RECHERCHES SUR LA TOXINE ET L'ANTITOXINE CHOLÉRIQUES

PAR MM. BRAU ET DENIER

(Travail du laboratoire de M. Roux.)

Lorsqu'en 1896, parut sur la toxine et l'antitoxine cholériques, le mémoire de MM. Metchnikoff, Roux et Salimbeni, le monde scientifique se trouvait divisé en deux partis. Les uns, à la suite de M. Pfeiffer², considéraient cette toxine, comme un poison endocellulaire, dont la production est intimement liée à la destruction des vibrions. Ils basaient leur théorie sur ce fait que la toxicité paraît en relation directe avec l'âge des cultures car c'est dans les cultures anciennes qu'ils trouvaient le poison cholérique en plus grande abondance.

MM. Behring et Ransom³, par contre, pensaient à une toxine soluble. D'autre part, MM. Metchnikoff, Roux et Salimbeni démontraient que l'âge des cultures n'est nullement le facteur indispensable de leur toxicité. Ils exposèrent en effet tout au long un procédé pour extraire de cultures jeunes un poison très actif. Le vibron qui servit à leurs recherches leur fut envoyé par M. Pfeiffer lui-même comme cholérique.

Pour lui conserver son pouvoir toxigène, ces expérimentateurs le cultivaient in vivo à l'abri des cellules de l'organisme : d'où la méthode des sacs de collodion introduits dans le péritoine des cobayes.

Le milieu de culture qui parut leur donner les meilleurs résultats est composé d'eau peptonée, additionnée de gélatine, à laquelle on ajoute du sérum en proportions déterminées.

Les cultures faites en large surface et mince épaisseur donnent un poison très actif pour le cobaye, le lapin, la souris, le pigeon. Il résiste à la température de l'ébullition, est très soluble dans l'eau, précipitable par l'alcool fort et le sulfate

1. *Annales de l'Institut Pasteur* 1896, n° 5.

2. *Zeitschrift für Hygiene* 1896, Vol. 11.

3. *Deutsche medicin. Wochenschrift*. 1895, n° 29.

d'ammoniaque. En présence de l'air et de la lumière, il perd beaucoup de son activité; le poison a servi à l'immunisation de différents animaux (cobaye, lapin, cheval). Chez ce dernier, notamment, la toxine cholérique injectée par la voie sous-cutanée d'abord, dans les veines ensuite, donna un sérum spécifique dont l'action fut très nette chez de jeunes lapins atteints d'un choléra expérimental.

Le même sérum appliqué dans les Indes à la thérapeutique humaine par le docteur Simond donna des résultats encourageants.

En 1903, parut sur le vibron de Nasik, isolé dans cette ville d'un cas de choléra typique par le docteur Simond, un mémoire de M. Kraus¹, dans lequel cet expérimentateur conteste à ce vibron le titre de cholérique. Il n'est pas agglutiné par un sérum anticholérique: son sérum n'agglutine que peu ou point les vibrions cholériques. Les mélanges de sérum et de filtrats ne donnent pas lieu à la formation de précipité. Il donne en culture liquide une hémolysine, sur laquelle l'antihémolysine des sérums spécifiques demeure sans action. Enfin, dans ces conditions, il donne un poison soluble à effets rapides, ce qui pour M. Kraus n'existe jamais dans les cultures de vibrions cholériques authentiques.

Ce poison extrêmement actif, non seulement pour le lapin, par la voie veineuse, mais encore pour le cobaye, le chien, le pigeon, la souris, est détruit à la température de 58°, et serait par conséquent très voisin des toxines diphtérique et tétanique.

Cette toxine donne naissance à une antitoxine.

Mais, et c'est là la particularité de ce travail, le sérum de certains animaux (chèvre, lapin, cheval) contient normalement un anticorps qui ne manifeste son action antitoxique, qu'après un certain temps de contact in vitro avec la toxine. La préparation rend simplement immédiate l'action de cette substance.

Enfin en 1905, le même expérimentateur, en collaboration avec M. Pribram², étudiant les six vibrions d'El Tor isolés par M. Gotschlich, constatèrent que ces vibrions, outre les propriétés des cholériques vrais (phénomène de Pfeiffer, agglutination), peuvent encore produire, en milieu liquide, une

1. *Centralbl. f. Bakl.* Vol. 34, n° 6.

2. *Wien. klinisch. Wochenschrift.* 1905, n° 39.

hémolysine et un poison soluble à action rapide tout à fait analogue à celui du Nasik.

Le sérum normal du cheval, de la chèvre, du lapin, neutralise cette toxine à la condition toutefois que le contact *in vitro* se prolonge au moins une demi-heure. La neutralisation avec les sérums préparés est instantanée.

Tels sont les principaux travaux qui depuis dix ans furent publiés sur la toxine cholérique.

Dans ce mémoire, nous ne nous proposons pas de démontrer la présence d'un poison soluble dans les cultures de vibrions cholériques en milieu liquide. Cette toxine, en effet, bien que contestée par beaucoup d'auteurs, a été bien mise en évidence dans les travaux de MM. Metchnikoff, Roux et Salimbeni. Nous voulons simplement déterminer d'une façon précise sa nature, ses caractères, les propriétés de son antitoxine, de façon à l'appliquer avec fruit, si possible à la sérothérapie humaine.

I

PRÉPARATION DE LA TOXINE

Le vibron employé dans toutes ces recherches a été isolé à Saïgon, par nous-mêmes, des selles d'un cholérique dont l'affection, quoique bénigne, fut tout à fait caractéristique (crampes, vomissements, selles à grains riziformes, hypothermie, lipothimie).

Tous ces symptômes s'amendèrent en quelques heures et le malade entra dans la période de congestion. 15 jours après, il quittait l'hôpital complètement rétabli. Le vibron est classé dans notre collection sous la rubrique vibron B. 1903.

Au point de vue morphologique, il est court, trapu, courbé sur l'un de ses bords, d'une assez grande mobilité due à la présence d'un cil souvent bifurqué à l'une de ses extrémités. Il prend toutes les couleurs d'aniline et ne se colore pas par la méthode de Gram.

Il cultive dans les milieux ordinaires, coagule rapidement le lait, liquéfie la gélatine et le sérum coagulé.

En eau peptonée, il donne la réaction indol nitreuse, et chez le cobaye, activement ou passivement immunisé, le phénomène de Pfeiffer. Enfin par l'injection de 8 cultures de ce vibron dans les veines d'un cheval, on obtient, en 2 mois, un sérum dont 0gr, 0002 agglutine à la dilution de 1/10000 le vibron de Kolle n° 74.

Actif chez le cobaye, même en injection sous-cutanée, il provoque la

péritonite expérimentale à la dose de 1/30 de culture de 24 heures sur gélose. L'injection veineuse chez le lapin et chez le chien donne lieu à des accidents extrêmement sévères. Par contre, son pouvoir pathogène pour le pigeon est peu marqué.

Ensemencé en milieu liquide, dans le bouillon Martin par exemple, fortement alcalinisé, ce vibrion donne un liquide toxique pour le cobaye de 250 grammes à la dose de 2 c. c.

Nous avons donc recherché quelles modifications nous apporteraient un accroissement de toxicité.

Nous avons fait choix des milieux albumineux pour deux raisons. D'abord nous nous sommes basés sur les propriétés protéolytiques de ce vibrion, et d'autre part sur ce fait que dans les pays chauds une attaque brusque de choléra est la complication fréquente de la dysenterie.

Nous avons donc successivement ajouté au bouillon Martin le sérum de certains animaux dans les proportions suivantes : 25, 50 et 75 0 0. Ces modifications apportèrent une augmentation notable de la toxicité, rendue plus apparente encore par l'adjonction de sang défibriné.

Après de nombreux essais, nous avons finalement adopté le milieu suivant :

Sérum normal de cheval.....	90 c. c.
Sang défibriné.....	10 —

Sur ce milieu, chauffé à 60° pendant 3 heures et qui, dans ces conditions, a pris l'aspect d'une gelée brun foncé, ce vibrion, après 24 heures d'étuve, donne une sorte de pellicule grisâtre et un commencement d'hémolyse. Le milieu, 36 heures après l'ensemencement, se divise en deux parties : une couche profonde qui comprend tous les éléments solides, et le sérum recouvert d'un voile plus ou moins épais.

Dès le 3^e jour, sous l'action de l'agitation journalière, cette division disparaît pour faire place à un liquide uniformément brun.

Le 7^e jour, ces cultures présentant à ce moment leur maximum de toxicité sont filtrées sur papier, puis sur bougie Chamberland F ou Berkefeld et donnent un liquide brun acajou.

Les filtrats sont toutefois toxiques dès le 4^e jour. Examinée

au microscope, 24 heures après son ensemencement, l'une de ces cultures ne présente que de rares éléments mobiles : l'agglutination sous l'action du sérum normal de cheval est quasi complète. On ne trouve plus trace de vibrions mobiles à partir du 4^e jour.

Nous constatons également à l'examen des lames colorées des modifications très importantes dans la morphologie de ce microbe. De très bonne heure en effet, apparaissent des formes filamenteuses, arrondies, en poire, qui augmentent rapidement, et dès le 4^e jour, on n'aperçoit guère dans le champ du microscope que des éléments arrondis prenant très mal les matières colorantes.

Une trace de cette culture, repiquée chaque jour sur gélose et sur bouillon, cesse de donner une nouvelle culture à partir du 4^e jour, quelquefois même dès le 3^e.

En résumé, la production de cette toxine semble se faire en deux temps. Le 1^{er}, qui va jusqu'au 3^e jour, est caractérisé par un développement intensif de la culture. Le 2^e, qui s'étend du 3^e au 7^e jour, est surtout une macération des vibrions dans le sérum.

Quand on veut, par ce procédé, obtenir une toxine présentant son maximum d'activité, il paraît indispensable d'observer les prescriptions suivantes :

1^o Le sérum entrant dans la composition de ce milieu doit être âgé d'au moins trois semaines. Il est presque impossible d'obtenir des cultures toxiques avec du sérum frais. Les mêmes remarques s'appliquent au sang défibriné. Enfin, comme nous l'indiquons plus haut, ce milieu doit être maintenu à la température de 60° à 61° pendant 3 heures ;

2^o La richesse d'une culture, et conséquemment sa toxicité sont en raison directe de l'abondance de l'ensemencement. Il faut en moyenne 2 tubes de gélose de 24 heures pour 50 c. c. du milieu de culture ;

3^o Comme l'ont indiqué MM. Metchnikoff, Roux et Salimbeni dans leur mémoire, l'aération joue un grand rôle dans le développement de la toxicité. Aussi cultivons-nous comme eux en large surface et mince épaisseur. Pour augmenter encore cette aération les boîtes sont agitées chaque jour ;

L'étuve dont on fait usage doit avoir une température

rigoureusement constante, et il n'est pas rare de voir des variations de 1° amener une déperdition notable de la toxicité. La température optima paraît être 39° ;

5° Le vibron cholérique, pour rester toxigène, ne doit subir aucun passage chez les animaux. Diverses expériences nous ont permis de constater que cette propriété, sous l'action des passages, diminue avec une très grande rapidité ;

6° Enfin la température optima pour la conservation du vibron nous paraît être celle de la chambre. Si nous ne pouvons dire que la température de la glacière lui soit nuisible, nous pouvons du moins affirmer qu'elle n'est d'aucune utilité.

II

PROPRIÉTÉS DE LA TOXINE CHOLÉRIQUE

Le liquide ainsi obtenu présente une coloration brune plus ou moins foncée, une réaction alcaline nette. Son principe actif est soluble dans l'eau, insoluble dans l'alcool fort et précipitable par le sulfate d'ammoniaque. Il dialyse à travers une membrane de collodion. D'autre part ces toxines simplement filtrées sur cette membrane conservent toute leur activité.

Les agents physiques, air et lumière combinés, paraissent avoir sur ce produit une faible action.

Action de la chaleur. — Portée à la température de l'ébullition, la toxine cholérique paraît peu modifiée sous l'action de la chaleur et détermine, chez le cobaye, des accidents tout à fait identiques à ceux observés avant le chauffage. Il faut au moins la soumettre à la température de 120° pendant 20 minutes pour lui faire perdre ses propriétés toxiques.

Par contre, injectée au lapin après un chauffage à 100°, cette toxine nous avait paru privée de tout pouvoir toxique pour cet animal. Nous pensions donc, en conformité d'ailleurs avec l'hypothèse émise en 1892 par M. Gamaleia, nous trouver en présence de deux toxines : l'une thermostable, probablement l'endotoxine, l'autre thermolabile, vraisemblablement la toxine soluble. Le cobaye était très sensible à la première, et pour la seconde le lapin se trouvait être le réactif de choix.

Toutefois, en présence de certains résultats contradictoires, nous refîmes l'expérience de la façon suivante :

16 lapins, autant que possible comparables entre eux, sont divisés en deux lots. Les uns reçoivent la toxine en bouillon Martin, les autres celle en sérum. Tous ces animaux reçoivent le poison dans la veine de l'oreille. Enfin dans chaque groupe, 4 sont inoculés avec la toxine chauffée, les autres servant de contrôle.

Les résultats obtenus ont été les suivants : sur les 8 témoins, 5 sont morts en un laps de temps qui oscille entre quelques heures et 5 jours.

Parmi les 8 lapins qui reçurent la toxine chauffée, 2 seulement succombèrent, mais l'un d'eux présenta une intoxication extrêmement rapide qui l'emporta en quelques heures. Si on considère d'autre part que la résistance individuelle du lapin à cette toxine est extrêmement variable, nous arrivons à cette conclusion que cet animal est vis-à-vis d'elle un réactif infidèle, et qu'il nous est impossible de déterminer avec lui, et d'une façon précise, l'action du chauffage sur cette toxine.

Inoculations expérimentales. — Inoculée aux animaux, cette toxine manifeste brusquement ses effets sans période d'incubation.

Chez le cobaye, dans le péritoine ou sous la peau, elle donne toute une série de symptômes sur lesquels nous passerons brièvement, leur description complète en ayant été faite dans le mémoire de MM. Metchnikoff, Roux et Salimbeni.

Comme l'ont montré ces auteurs, l'animal en expérience devient triste, son poil se hérisse, le ventre se distend et devient douloureux à la pression, sa température rectale peut descendre à 26° et 25°. La nécropsie offre, suivant l'inoculation, un œdème sous-cutané ou un épanchement péritonéal abondant.

Les organes abdominaux, et particulièrement les capsules surrénales, sont congestionnés. L'intestin, qui présente la teinte hortensia, contient souvent de la diarrhée.

La dose minima mortelle pour un cobaye de poids moyen de 250 grammes est environ 1/2 c. c. Ce n'est qu'exceptionnellement que ces toxines se montrent actives au 1/4 de c. c.

Par la voie veineuse, la toxine cholérique détermine surtout de

la dyspnée: dans ce cas, elle est active au $1/4$ et au $1/10$ de c. c.

Quelques essais d'inoculation de cette toxine directement dans l'intestin grêle sont demeurés sans résultats. Le lapin présente à la toxine cholérique une sensibilité très différente suivant le mode d'inoculation. Introduit par la voie péritonéale ou sous-cutanée, à haute dose toutefois, ce poison produit chez les animaux en expérience des symptômes sans précision.

Généralement les animaux sont tristes, ne mangent pas et dans certains cas peuvent présenter de la diarrhée.

Le signe le plus net est l'émaciation et le lapin perd en quelques jours le $1/3$ de son poids. La mort survient en 3 ou 4 jours: la nécropsie ne révèle aucune lésion caractéristique.

Lorsque la toxine est directement introduite dans la circulation, l'évolution de la maladie est en général beaucoup plus rapide.

Peu après l'injection, l'animal devient inquiet, présente de la dyspnée, des coliques, une diarrhée souvent d'une extrême abondance, mais qui dans certains cas foudroyants peut manquer complètement. Tous ces symptômes s'aggravent, et finalement l'animal succombe en quelques heures. Comme nous l'avons dit plus haut, la résistance individuelle du lapin est extrêmement variable et souvent l'animal se rétablit. Mais en général il ne mange pas, s'émacie et meurt, suivant le cas, de 2 à 8 jours après l'injection. Quelquefois même, il résiste. Il n'est pas rare alors d'observer, 2 à 3 semaines après l'expérience, l'apparition de troubles nerveux caractérisés soit par de l'hémiplégie, soit par de la paraplégie. La paralysie se généralise avec une très grande rapidité et l'animal meurt en 24 heures.

Chez les animaux qui succombent rapidement à l'intoxication, on observe une congestion intense des organes abdominaux et de l'intestin: mais d'une façon générale l'autopsie ne présente rien de caractéristique.

Contrairement aux faits observés chez le cobaye, l'inoculation de cette toxine dans l'intestin grêle, à dose élevée (20 c.c.) cause la mort de l'animal. Malheureusement, chez beaucoup d'animaux qui succombent, l'exsudat péritonéal renferme souvent des microbes, qui vraisemblablement proviennent de l'intestin.

Pour les lapins de 1^{kg},500 à 2. kilogr, les dose mortelles par les différentes voies sont les suivantes : Sous la peau, il faut compter 15 à 20 c. c. La dose minima mortelle par la voie péritonéale est un peu moins élevée, 10 à 15 c. c. Enfin, par la voix veineuse, il suffit de 0,5. c. c. à 1,5 c. c. pour tuer en quelques heures les animaux de ce poids.

Comme nous venons de le voir pour le lapin, et ainsi que nous le constaterons plus loin pour le cheval, la toxine cholérique, chez le chien, produit son maximum d'effet par la voie veineuse. Inoculée, même en grande quantité, sous la peau ou dans le péritoine, elle détermine chez cet animal une hyperthermie passagère, qui ne dépasse guère 24 heures, Sous la peau particulièrement, si la résorption n'est pas hâtée et facilitée par le massage, il se fait au point inoculé une tumeur fluctuante qui s'escharrifie et se vide ; finalement la plaie se cicatrise.

Le poison cholérique introduit directement dans la circulation donne naissance à des accidents extrêmement rapides et tout à fait analogues à ceux observés dans l'injection veineuse de corps de microbes vivants. La mort est la règle et survient en 2 à 5 heures avec vomissements, hypothermie, lipothimie, diarrhée tantôt séreuse à grains riziformes, tantôt bilieuse. A l'autopsie on constate une congestion intense de tous les organes thoraciques et abdominaux. L'intestin, qui extérieurement présente la teinte hortensia, possède une muqueuse extrêmement congestionnée et sanieuse sur la plus grande partie de son étendue. Il est rempli par un liquide séreux, ainsi que par des débris de muqueuse qui, versés dans un cristalliseur contenant de l'eau donnent tout à fait l'aspect de grains riziformes.

La dose minima mortelle pour le chien de 5 à 6 kilogr. varie entre 5 et 10 c. c.

L'inoculation de 30 c. c. de cette toxine dans la jugulaire d'un cheval de poids moyen (300 à 400 kilogr.) est extrêmement sévère et détermine en général la mort en quelques heures. L'animal présente de la lipothimie, de la fréquence des battements du cœur, de la dyspnée, des coliques et de l'hypothermie qui reste le plus souvent localisée aux membres. Et ce n'est qu'exceptionnellement au moment de la mort que la température rectale accuse un abaissement de 1°. Si la mort ne survient pas rapidement, elle se produit alors en quelques jours.

En ce cas, 5 à 6 heures après le début de l'expérience, la température monte à 40° ou plus et se maintient ainsi élevée, avec une rémission matinale toutefois, jusqu'à la mort. On ne trouve à l'autopsie qu'un état plus ou moins congestif de tous les organes.

Sous la peau, cette toxine ne produit des accidents mortels qu'à des doses considérables (200 c. c.).

La souris paraît peu sensible à cette toxine et en supporte sans accidents 1 c. c. soit par la voie sous-cutanée, soit par la voie péritonéale.

III

VACCINATION ANTICHOLÉRIQUE. IMMUNITÉ ACTIVE

Les animaux sur lesquels ont été entreprises ces expériences sont le cobaye, le lapin, la chèvre, le cheval.

L'immunisation du cobaye par la voie péritonéale paraît extrêmement difficile et nous a donné des résultats médiocres. En général, quelles que soient les précautions prises dans le cours de l'immunisation, dès que la quantité du poison, injectée en une seule fois, avoisine la dose mortelle, l'animal maigrit, se cachectise et meurt. Souvent même, à de très petites doses, on le voit brusquement après l'injection présenter tous les symptômes ordinaires de l'intoxication. Il semble en un mot que pour ces animaux il y ait sensibilisation et non vaccination.

Cette difficulté d'immunisation s'accuse encore plus nettement dans les expériences suivantes :

Des cobayes reçoivent en injection péritonéale une dose inférieure à la mortelle. Ils se rétablissent et reprennent leur poids. Huit jours après, en même temps qu'à plusieurs témoins, on leur injecte une dose sûrement mortelle de toxine cholérique, tous les animaux meurent ensemble.

La même expérience sous une autre forme aboutit à la même conclusion.

Des cobayes de 500 à 600 grammes ont reçu en 2 mois plus de la dose mortelle de toxine, soit 8 c. c. Huit jours après la dernière injection, qui avait été de 3 c. c., ils reçoivent en injection péritonéale 7 c. c., ainsi d'ailleurs que plusieurs témoins. Ils meurent avant les animaux de contrôle.

En résumé, dans les conditions où nous nous sommes placés, pas de vaccination chez des animaux qui reçoivent un peu moins de la dose mortelle; pas davantage d'immunité chez des cobayes qui, en plusieurs injections, reçurent une quantité de toxine supérieure à la dose mortelle.

Les tentatives d'immunisation ont été faites chez le lapin successivement par la voie péritonéale, la voie sous-cutanée et la voie veineuse.

Dans le péritoine le lapin supporte assez bien le poison cholérique et nous arrivons rapidement à injecter 40 c. c. à la fois. Nous n'avons d'ailleurs jamais dépassé cette dose. Toute inoculation s'accompagne toujours d'un amaigrissement passager.

Nous avons ainsi injecté jusqu'à 150 c. c. de cette toxine au même animal. Néanmoins ces lapins ne résistent pas à une dose sûrement mortelle de toxine injectée par la voie veineuse.

Même absence d'immunisation lorsque le poison se trouve introduit dans l'organisme par la voie sous-cutanée. L'opération comporte certains inconvénients dès qu'on arrive à l'injection de doses massives (20 c. c.). La résorption est lente, en peu de temps, tout le liquide non absorbé s'amoncelle au niveau des parties déclives et détermine l'irritation du tissu conjonctif. Il se fait des indurations qui s'ulcèrent et se contaminent : finalement l'animal se cachectise et meurt. Leur contenu est stérile ou contient le coccobacille de la septicémie du lapin.

Le résultat nous a paru tout à fait différent quand la toxine est injectée par la voie veineuse. On peut ainsi, en procédant avec précautions arriver à vacciner les lapins.

La dose minima mortelle étant de 3 c. c. environ pour les animaux de 1,000 à 1,500 gr., on peut arriver à leur injecter 5 et 6 c. c. de cette toxine. Mais on ne peut jamais dépasser ces doses, et à 7 c. c. les animaux meurent absolument comme les témoins.

Ainsi donc l'inoculation de cette toxine par la voie veineuse détermine chez les lapins traités une immunité active; mais cette immunité reste strictement limitée à l'injection de 2 doses mortelles. Cette quantité étant passée, les animaux vaccinés ne paraissent plus protégés.

La chèvre supporte d'une façon parfaite l'inoculation sous-

cutanée de cette toxine, et on arrive en très peu de temps à des injections de 100 c. c. à la fois. Les seuls symptômes consécutifs à l'inoculation sont une hyperthermie passagère et un œdème local dont l'importance semble s'accroître avec le nombre des injections. L'une de ces chèvres, qui avait reçu 600 c. c. par ce procédé, a été très malade à la suite d'une injection veineuse de 5 c. c. de cette toxine.

Par la voie veineuse, les tentatives d'immunisation ont échoué et dans les deux essais les animaux sont morts après une injection de 4 et 5 c. c., la quantité totale du liquide inoculé étant dans les 2 cas de 25 c. c.

La toxine cholérique, sous la peau du cheval, produit des accidents comparables à ceux observés chez le lapin. Des 2 chevaux traités par ce procédé, l'un est mort avant d'avoir reçu 100 c. c. de cette toxine; l'autre présenta un tel amaigrissement que le traitement fut suspendu.

Inoculé dans les veines au contraire, cette toxine détermine une immunité très nette chez l'animal en traitement. Il est indispensable toutefois, pour obtenir une bonne vaccination, de procéder surtout au début avec des doses extrêmement faibles.

D'autre part, comme nous l'avons signalé à propos du lapin, la quantité à inoculer à la fois ne peut jamais dépasser 2 doses mortelles. Les quelques tentatives pour enfreindre cette loi nous ont valu de gros amaigrissements, qui retardèrent les vaccinations de plus d'un mois.

Peu après l'inoculation, l'animal présente du tremblement, des coliques, de la diarrhée (ce dernier symptôme fait souvent défaut). En même temps la température monte à 40° et 40°,5. Mais dans une vaccination bien conduite, cet hyperthermie est passagère et le soir même la température redevient presque normale. Il ne faut jamais injecter une quantité de toxine capable de causer de l'hypothermie. Enfin, lorsque, après une injection, on constate un amaigrissement notable il vaut mieux suspendre tout traitement jusqu'au rétablissement complet de l'animal.

IV

PROPRIÉTÉS DU SÉRUM ANTICHOLÉRIQUE

Les sérums utilisés dans ces expériences ont été préparés par la voie sous-cutanée ou la voie veineuse chez le lapin, la chèvre, le cheval, de la façon suivante :

Lapin A (voie veineuse).....	70 c. c.
Lapin B (voie sous-cutanée).....	70 —
Chèvre A (voie veineuse).....	25 —
Chèvre B (voie sous-cutanée).....	600 —
Cheval (voie veineuse).....	550 —

Mélangé à la dose minima mortelle de toxine, le sérum normal des animaux précités paraît avoir une action antitoxique, mais cette propriété neutralisante est très limitée, et dès 2 doses mortelles, ces sérums ne présentent plus aucune activité.

Les sérums préparés par la voie sous-cutanée chez la chèvre et chez le lapin ont un pouvoir antitoxique faible. Ce pouvoir augmente rapidement si le poison cholérique est injecté par la voie veineuse. Un cinquantième de centi-cube du sérum d'un cheval qui a reçu 1/2 litre de toxine dans la jugulaire neutralise, après 1/2 heure de contact in vitro, 2 doses mortelles de toxine. Toutefois, ce sérum ne paraît pas suivre la loi des multiples. Il faut, en effet, 1/20 de c. c. pour la neutralisation de 3 doses. 4 doses exigent 1 c. c. Enfin 2 c. c. de ce sérum sont nécessaires pour rendre 6 doses de cette toxine complètement inactives.

Injecté préventivement sous la peau d'un cobaye, il protège contre l'intoxication expérimentale (voie péritonéale) pendant une dizaine de jours environ. Les animaux redeviennent ensuite aussi sensibles que leurs témoins.

Dans l'injection simultanée du sérum et de la toxine, mais par des voies différentes (toxine peau, sérum péritoine), on peut encore intervenir avec succès 2 heures après l'inoculation du poison cholérique. Dans le cas contraire, les résultats obtenus se sont montrés beaucoup moins favorables. Quelques tentatives d'intervention chez le cobaye par la voie veineuse sont demeurées sans résultats. Le traumatisme nécessité en effet par cette injection met cet animal dans un état de moindre

résistance tel, que les résultats de l'expérience sont tout à fait faussés.

Outre sa propriété antitoxique, ce sérum est encore antimicrobien. En injection sous-cutanée 16 heures avant l'expérience, il protège sûrement le cobaye à la dose de 1/30 de c. c. contre la péritonite vibrionienne.

Il est également agglutinant. En effet, ce sérum agglutine à la dilution de 1/1500 non seulement le vibron B 1903, notre producteur de toxine, mais encore le vibron de Kolle n° 74.

Enfin ce sérum est précipitant : mélangé aux filtrats, dans des proportions atténuées, il donne un trouble léger.

Le sérum préparé avec des toxines chauffées à 100° pendant 20 minutes présente des propriétés en tous points comparables à celles du sérum précédent.

Avant de terminer cette étude du sérum anticholérique, nous tenons à dire un mot d'un autre sérum préparé par la voie veineuse avec des corps de microbes vivants. Ce sérum, ainsi mis à notre disposition, a été préparé par M. Salimbeni. Non seulement il présente toutes les propriétés du sérum antitoxique, mais encore, dans nos expériences de comparaison, il s'est montré plus actif.

Ainsi donc, un sérum préparé avec des corps de microbes vivants, peut être antitoxique si ces microbes sont introduits par la « voie veineuse ». Un sérum ainsi préparé se montre même plus actif que les sérums antitoxiques.

Nous nous trouvons là en présence d'un fait observé depuis longtemps à l'Institut Pasteur dans la préparation du sérum antipesteux, et signalé depuis par M. Besredka dans ses études de l'endotoxine typhique et de l'endotoxine pesteuse.

CONCLUSIONS :

1° Dans les milieux liquides en général, et tout particulièrement en milieu albumineux, un vibron cholérique, s'il n'a fait aucun passage sur les animaux, donne une toxine soluble, à action rapide sans incubation ;

2° La production de cette toxine semble liée à la macération des vibrions ;

3° Cette toxine se montre très active quand elle est injectée dans les veines ;

4° L'injection sous-cutanée de cette toxine chez les animaux (chèvre, lapin, cobaye, cheval) leur donne difficilement une immunité active. Le sérum ainsi obtenu par ce procédé est faiblement antitoxique ;

5° L'injection intraveineuse au contraire vaccine les animaux et fait apparaître dans leur sérum des propriétés antitoxiques très manifestes ;

6° Les animaux qui reçoivent dans les veines des cultures vivantes fournissent un sérum plus actif que ceux traités avec les toxines solubles ;

7° Pour toutes ces raisons, il semble qu'il n'y avait pas lieu d'établir de distinction entre la toxine cholérique contenue dans les corps de microbes et celle obtenue dans les liquides de culture.

Nouvelles recherches sur la spirillose des poules

PAR MM. LEVADITI ET MANOUELIAN

Avec la planche XXVII

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

L'emploi de la méthode d'imprégnation à l'argent associé à la pyridine, que nous avons récemment recommandée, pour la coloration sur coupes du *Treponema pallidum*¹, nous a permis d'étudier de nouveau, et à des points de vue divers, la septicémie que provoque chez les poules le *Spirillum gallinarum* découvert au Brésil par Marchoux et Salimbeni². Nous apportons ici les résultats de nos recherches concernant l'histologie pathologique de cette septicémie, le mécanisme de la crise qui préside à la disparition des spirilles à la fin de l'infection, ainsi que la pénétration de ces spirilles dans les ovules des animaux infectés. Une partie de ces résultats ont été déjà consignés dans une note présentée par nous à la Société de Biologie, séance du 20 janvier 1906.

I

HISTOLOGIE PATHOLOGIQUE

Parmi les organes prélevés chez la poule à divers moments de l'infection, seuls le foie et la rate ont présenté des altérations apparentes. Dans le foie, ces lésions consistent en une dégénérescence granulo-graisseuse des éléments glandulaires, d'autant plus marquée que la maladie est avancée, et en une infiltration par des cellules mononucléaires des régions qui entourent les vaisseaux. La rate offre, en dehors d'une richesse inaccoutumée de la

1. C. R. de la Société de Biologie, vol. XL, pag. 134.

2. Nous avons appliqué avec succès la même méthode à l'étude de la fièvre récurrente africaine (tick fever) chez les animaux d'expérience (souris, singe); le virus nous a été obligeamment envoyé par M. le professeur. Koch que nous remercions chaleureusement ici. Nos recherches en cours seront publiées bientôt et compléteront les constatations récentes de Bertarelli (*Rivista d'igiene*, 1906) ayant trait au spirille d'Obermeier.

pulpe en macrophages plus ou moins vacuolisés, des foyers microscopique de nécrose, foyers constitués par un tissu d'aspect uniforme et hyalin.

Les spirilles, dont le nombre varie suivant la période de l'infection, existent soit dans la lumière des vaisseaux sanguins, soit dans le parenchyme des divers viscères, répandus parmi les éléments cellulaires qui entrent dans la constitution de ce parenchyme.

Les parasites intra-vasculaires plus ou moins longs, plus ou moins ondulés, sont pour la plupart libres et flottent au milieu des globules rouges et des leucocytes. Il n'est pas rare de rencontrer des spirilles dont les dimensions dépassent celles des microorganismes que l'on rencontre habituellement dans le sang, et qui sont emprisonnés dans une sorte de masse albumineuse coagulée, colorable d'une façon intense par les couleurs d'aniline. Cette disposition particulière des spirilles intra-vasculaires rappelle en tout point les constatations analogues que nous avons faites lors de l'étude de la répartition du *Treponema pallidum* dans des syphilomes primaires de l'homme¹.

Vers la période finale de la septicémie brésilienne, les spirilles contenus dans les vaisseaux montrent une tendance à s'agglutiner; néanmoins les amas formés par ces spirilles sont extrêmement petits et, en tout cas, sensiblement moins développés que les mêmes amas de spirilles rencontrés dans les préparations de sang obtenu par piqûre pendant la vie de l'animal. Ce fait confirme ce que l'un de nous a soutenu auparavant², à savoir que l'agglutination des spirilles que l'on constate dans le sang des poules, peu avant la crise, est un phénomène réalisé par les conditions spéciales où se trouve ce sang retiré de l'organisme, et qui ne correspondent guère à ce qui se passe dans les humeurs de l'animal en expérience.

Les coupes de rate et surtout celles qui intéressent le foie montrent que les spirilles ne se cantonnent pas dans le système vasculaire, mais ils envahissent les tissus nobles, pour entrer en contact direct avec les éléments histologiques.

Ainsi dans la *rate* on remarque que ces spirilles se répandent abondamment parmi les macrophages de la pulpe

1. C. R. de la Société de Biologie. Séance du 25 novembre 1905, p. 529.

2. LEVADITI, Contrib. à l'étude de la spirillose des poules. Ces *Annales*, vol. XVIII, mars 1904.

splénique et qu'ils s'accumulent également au niveau des foyers de nécrose dont nous venons de parler. On saisit aisément les relations de causalité qui relient cette accumulation des parasites dans ces foyers nécrotiques et la genèse de ces altérations.

Dans le *foie*, les spirilles sont sensiblement plus nombreux ; on les voit se grouper contre la paroi des capillaires intralobulaires, quitter ces capillaires et s'infiltrer entre les cellules hépatiques. La figure 1 (Pl. XXVII) montre d'une façon très nette cet envahissement des lobules et des trabécules hépatiques par les spirilles, ainsi que l'existence d'un contact intime entre les éléments glandulaires et le parasite de la septicémie brésilienne. Chaque cellule du foie est pour ainsi dire enclavée dans un réseau de spirilles, lesquels s'insinuent entre les minces espaces qui séparent les unités anatomiques. Malgré l'examen attentif de nos préparations, il nous a été impossible de nous convaincre de l'existence des spirilles dans le protoplasma des éléments glandulaires. Il est vrai que çà et là on voit un spirille disparaître dans la profondeur du corps cellulaire, mais encore une fois, le grand nombre des parasites d'une part, la petitesse relative des cellules hépatiques d'autre part, rendent presque impossible la précision des relations qui existent entre le corps cellulaire et les spirilles.

Rappelons enfin que certains vaisseaux hépatiques ont leur paroi infiltrée par de nombreux spirilles ; ceux-ci suivent les fentes qui séparent les fibres musculaires et conjonctives de la paroi vasculaire, pour arriver au contact de l'endothélium. Cette disposition particulière des spirilles ressemble à celle que l'un de nous¹ a décrite dans le *foie* des nouveaux-nés hérédosyphilitiques :

L'examen des autres organes (rein, poumon, moelle osseuse, capsules surrénales, ovaire, testicule) nous a montré que les spirilles abondent exclusivement dans le système vasculaire et qu'ils sont soit libres, soit légèrement agglutinés.

Si l'on étudie la disposition et le nombre des spirilles contenus dans les divers organes des poules sacrifiées, à un moment où le sang périphérique se montre encore dépourvu de parasites (commencement du 2^e jour par exemple), on remarque que les vaisseaux du foie et surtout ceux de la moelle osseuse

1. LEVADITI, ces *Annales*, janvier 1906.

et de l'ovaire renferment des quantités appréciables de parasites. Plus encore, il nous a été donné de rencontrer des cas où, malgré la pauvreté en spirilles du sang circulant, le parenchisme hépatique contenait de nombreux éléments spirilliens. Ce fait nous amène à penser qu'une multiplication active de ces microorganismes s'opère dans l'intimité même des organes glandulaires, multiplication qui surpasse celle qui a lieu dans le sang circulant, et qui doit fournir à ce sang une partie des parasites qu'il renferme.

Quant aux caractères morphologiques des spirilles rencontrés sur nos coupes, ils sont en général les mêmes que ceux que l'on a attribués à ces microorganismes d'après l'examen des frottis de sang. Pourtant, si on examine les spirilles qui sont en contact avec les éléments hépatiques par exemple, on remarque que, de par la fréquence de leurs tours de spire, ainsi que leur ténuité, ces spirilles se rapprochent beaucoup du *Treponema pallidum*. Cette ressemblance entre les deux espèces de spirilles tels que nous les révèle la méthode à l'argent, est à ce point frappante que parfois, en examinant avec un grossissement plus faible, il est impossible de distinguer une coupe de foie de poule infectée d'une coupe de foie de nouveau-né hérédo-syphilitique.

La multiplication des spirilles contenus dans les gros vaisseaux ou existant dans les divers parenchymes s'opère par division transversale. Ce qui nous le fait croire, c'est d'une part l'existence fréquente d'éléments spirilliens disposés bout à bout et réunis parfois par un mince filament, et d'autre part l'absence de spirilles en forme de V, pouvant indiquer une segmentation longitudinale de ces parasites.

II

MÉCANISME DE LA CRISE

Nous n'insisterons pas ici sur les divers arguments tirés de l'étude expérimentale et histologique de la septicémie brésilienne, qui ont amené l'un de nous à considérer la crise, ou plutôt la *lysis* qui met fin à cette septicémie, comme étant due à la destruction des spirilles par les macrophages de la rate et

du foie. Ces arguments, énoncés ailleurs¹, sont, d'une part, la discordance que l'on relève entre les propriétés des humeurs des animaux en train d'effectuer leur crise et l'acte même de la disparition des spirilles, et, d'autre part, la présence d'une phagocytose intense de ces spirilles, s'opérant au sein du parenchyme hépatique et surtout splénique.

Nos recherches actuelles ont confirmé et complété ces données obtenues avec des méthodes relativement imparfaites. Nous avons constaté, chez la plupart de nos animaux, un englobement plus ou moins intense des spirilles par les macrophages du foie et de la rate, englobement qui s'effectue à chaque instant, au cours de la maladie, et qui s'exagère vers la période précritique. La phagocytose est réalisée dans la rate par de gros éléments mononucléaires sis en pleines lacunes spléniques; ces éléments phagocytent des spirilles entiers, lesquels sont très souvent contenus dans des vacuoles qui renferment également du pigment résultant de la destruction des hématies. Dans le foie (fig. 2), cette phagocytose est opérée par les cellules de Kupfer, dont le protoplasma peut contenir trois ou quatre filaments spirilliens à la fois. Cet acte phagocytaire se termine toujours par la transformation de spirilles en des corpuscules de forme irrégulière et qui retiennent fortement l'argent et destinés à être définitivement digérés par le protoplasma leucocytaire. Ces corpuscules proviennent très vraisemblablement de spirilles dégénérés; ce qui nous le fait penser, c'est leur coexistence dans une même cellule, avec des fragments de spirilles enroulés sur eux-mêmes, disposés en forme d'anneau ou de boucle. Rappelons que malgré nos recherches réitérées, nous n'avons jamais rencontré soit dans les organes, soit dans les vaisseaux, des indices pouvant plaider en faveur d'une destruction extra-cellulaire des parasites de Marchoux et Salimbeni.

L'examen histologique des organes provenant d'animaux ayant déjà effectué leur crise, montre l'absence d'éléments spirilliens et pourtant, dans une expérience, l'injection d'émulsion de foie² pratiquée chez un *Padda* a montré que cette glande peut encore renfermer du virus actif un jour après la

1. LEVADITI, ces *Annales*, mars 1904.

2. Ce foie a été prélevé sur une poule sacrifiée 24 heures après la crise.

disparition des spirilles de la circulation générale (l'injection de sang a été inoffensive). Si la méthode des coupes ne nous a pas permis de déceler des spirilles dans ce foie, c'est qu'à ce moment le nombre des parasites ayant conservé leur intégrité devait être extrêmement minime, la grande majorité des spirilles ayant déjà été englobés et digérés par les phagocytes hépatiques et spléniques.

III

PÉNÉTRATION DES SPIRILLES DANS L'OVULE

Il était intéressant de rechercher si le *Spirillum gallinarum* est capable de pénétrer dans l'ovule des poules infectées, et cela à deux points de vue. Tout d'abord parce que les études récentes ont montré que l'hérédité syphilitique est due à l'envahissement de l'organisme fœtal par le *Treponema pallidum*, microorganisme apparenté au spirille de la septicémie brésilienne, et que, par conséquent, la transmission paternelle de la syphilis (loi de Colles) doit être assurée par la pénétration de ce tréponème dans l'ovule maternel. Ensuite, parce que les recherches de Koch¹ ont prouvé que le spirille de la fièvre récurrente africaine (tick fever) est capable d'infecter les ovules de *l'Ornithodoros moubata*, acarien qui, par sa piqure, transmet cette fièvre à l'homme. Or, on pouvait se demander si cette infection spirillienne de l'ovule qui chez *l'Ornithodoros* préside à la transmission héréditaire de la spirillose, peut être réalisée chez les animaux supérieurs, tels que la poule, par exemple.

Nos recherches nous ont montré que si les vaisseaux et même les tissus de l'ovaire renferment des spirilles chez les poules sacrifiées en pleine évolution de la maladie, les follicules de Graff ne contiennent pas trace de ces microorganismes. Il n'en est pas de même des ovules ayant un diamètre de 2 à 3 millimètres et qui sont légèrement pédiculés. Dans deux cas (infection datant de 3 et 4 jours), il nous a été possible, en effet, de découvrir un assez grand nombre de spirilles dans ces ovules. Leur disposition est la suivante :

Si l'on examine une coupe diagonale d'un ovule infecté, on

1. R. Koch, *Deutsche mediz. Woch.*, 25 nov. 1905.

constate (fig. 3) que la paroi ovulaire constituée par plusieurs assises de cellules pourvues d'un noyau rond ou ovalaire n'offre aucune lésion apparente. Le contenu de l'ovule, manifestement granuleux, est, dans sa partie centrale, dépourvu d'éléments figurés; par contre, dans la zone rapprochée de la paroi, ce contenu est parsemé de cellules en assez grand nombre, cellules dont la nature leucocytaire ne laisse aucun doute. Il s'agit, en effet, soit de gros éléments à protoplasma granuleux ou légèrement vasculaire, pourvus d'un seul noyau arrondi (*macrophages*), soit de leucocytes polynucléaires possédant tous les attributs caractéristiques de cette espèce leucocytaire. Ces globules blancs flottent librement dans le contenu de l'ovule, sont, rarement il est vrai, mélangés à quelques globules rouges et semblent se cantonner dans la région immédiatement contiguë à la paroi ovulaire.

Les spirilles renfermés dans l'ovule sont en assez grand nombre. Tous libres, ils sont répandus dans la masse granuleuse qui forme le contenu de cet ovule, et abondent surtout dans les régions pariétales, les plus riches en éléments cellulaires. Ces spirilles semblent plus longs que d'habitude, plus minces et offrent une tendance à se grouper par faisceaux de deux ou plusieurs microorganismes.

Ces constatations prouvent donc que le SPIRILLUM GALLINARUM peut, chez certains animaux sacrifiés en pleine évolution de la maladie, pénétrer dans les ovules avant atteint un certain développement. Reste à préciser le mécanisme de cette pénétration.

Il se peut que les spirilles aient traversé, grâce à leurs mouvements propres, la paroi de l'ovule, cela d'autant plus que dans les cas examinés par nous, le tissu ovarien était très riche en éléments spirilliens. Mais, étant donné qu'il nous a été impossible de saisir la présence de spirilles dans les diverses couches de la paroi ovulaire, nous nous garderons de considérer comme démontré ce mécanisme de la pénétration des parasites dans l'ovule. Il est également possible que la présence d'éléments spirilliens dans le contenu ovulaire soit due à la rupture d'un vaisseau et à l'hémorragie qui a pu s'opérer, à un moment donné, dans la paroi de l'ovule. Néanmoins, l'absence de globules rouges répandus dans l'ovule, que nous avons enregistrée précisément dans le cas où les spirilles endo-ovulaires étaient les

plus nombreux, nous autorise à rejeter également cette dernière hypothèse.

Nous sommes plutôt enclins à penser que les spirilles sont apportés dans l'ovule par les éléments leucocytaires que nous avons découverts dans le contenu ovulaire. En effet, toutes les fois qu'il nous a été donné de déceler des spirilles dans les ovules, nous avons rencontré en même temps des leucocytes; plus encore, ces spirilles ont été toujours plus nombreux dans les régions ovulaires les plus riches en globules blancs. Il est donc fort probable que l'ensemencement de l'ovule soit l'œuvre de ces globules blancs, lesquels, en traversant la paroi ovulaire, peuvent frayer un chemin au spirille; certains leucocytes, ayant préalablement phagocyté des spirilles vivants, peuvent d'ailleurs apporter directement le germe spirillien dans l'ovule.

Quoi qu'il en soit, nos constatations prouvent que l'infection spirillienne de l'ovule peut s'opérer chez les animaux supérieurs, fait dont l'importance au point de vue de la transmission héréditaire du *Treponema pallidum* chez l'homme est de premier ordre. Reste à savoir si les ovules, ainsi infectés par des spirilles, sont susceptibles d'être fécondés et de germer. Nous touchons là à la question de l'hérédité de la spirillose des poules, question déjà étudiée par l'un de nous (Levaditi) et dont les détails seront publiés bientôt.

Rappelons pour terminer que l'examen de plusieurs testicules de coqs sacrifiés en pleine infection spirillienne nous a montré l'absence de spirilles dans les cellules spermatiques.

Conclusions.

1. La septicémie brésilienne n'est pas due à une prolifération exclusivement vasculaire de *SPIRILLUM GALLINARUM*; ce parasite envahit les divers tissus glandulaires et entre en contact intime avec les divers éléments cellulaires. A l'encontre du *TREPOMENA PALLIDUM*, ce spirille ne semble pas pénétrer dans le protoplasma des cellules.

2. La crise qui met fin à l'infection spirillienne est due à la phagocytose des spirilles par les macrophages de la rate et du foie.

3. Le spirille de Marchoux et Salimbeni est capable d'infecter l'ovule des animaux en expérience.

UN SÉRUM TOXIQUE POUR LES NERFS PÉRIPHÉRIQUES

PAR LE D^r A. SCHMIDT, (DE MOSCOU)

Travail du laboratoire du professeur Metchnikoff.

Bordet¹ a montré que le sérum d'un animal, auquel on injecte du sang défibriné d'un animal d'espèce différente, acquiert la propriété de détruire les globules rouges de celui-ci. De même, en injectant à des animaux des émulsions de divers tissus, on a obtenu des sérums toxiques vis-à-vis des éléments employés. Le professeur Metchnikoff donne aux toxines de cette origine et possédant la propriété de tuer les cellules animales, le nom de cytotoxines. Dans un article bien connu², il indique un plan général pour leur étude et montre le rôle considérable qu'elles sont appelées à jouer en pathologie et, peut-être, également en thérapeutique.

On connaît les difficultés, particulières liées à l'obtention d'un sérum présentant des propriétés toxiques à l'égard des éléments cellulaires du système nerveux central. Ce qui distingue ce sérum, c'est que son action toxique ne se manifeste que lorsqu'il est introduit dans la cavité crânienne (Delezenne³). Introduit sous la peau ou dans le système circulatoire, il reste complètement inefficace.

Nous avons voulu essayer d'obtenir un sérum qui serait toxique pour une autre partie du système nerveux : pour les fibres de myéline. Ce qui nous a suggéré l'idée de ces recherches, ce sont les caractères bien tranchés de la myéline, caractères qui la différencient, tant au point de vue morphologique qu'au point de vue chimique, de tous les autres éléments de l'organisme. Nos expériences nous ont fourni des résultats positifs.

Comme animaux d'expérience, nous avons choisi les grenouilles; une émulsion de leurs nerfs sciatiques était introduite

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1898, p. 688.

2. *Archives russes de Pathologie*, 1901, XI, 2.

3. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1900, n° 10.

dans la cavité péritonéale de cobayes. Ce qui a guidé notre choix, c'est que, avec un peu d'habitude, il est facile d'avoir le nerf sciatique de cet animal depuis le point où il aboutit à la moelle épinière jusqu'à ses plus fines ramifications au genou. De plus, ces nerfs sont relativement gros. Enfin, ayant choisi comme sujet d'expérience la grenouille, nous pouvions introduire dans son organisme des doses relativement très considérables de sérum.

Nous avons opéré sur 3 cobayes; 2 ont reçu 6 fois des émulsions du nerf sciatique; le troisième 8 fois. Nous nous sommes servi, pour chaque injection, d'un nombre de grenouilles variant de 14 à 18, suivant leur taille. L'émulsion était obtenue en triturant, dans un mortier, des nerfs coupés en petits morceaux, et en ajoutant de la solution physiologique de chlorure de sodium de façon à obtenir 5 c. c. d'émulsion. Les injections étaient faites à 7-9 jours d'intervalle. Le sang était pris le 7^e ou le 8^e jour après la dernière injection.

L'action du sérum des cobayes ainsi traités, se manifestait sur la grenouille par un trouble physiologique, altération des mouvements, et par une lésion anatomique : modifications subies par les nerfs.

Généralement nous injectons 1 à 2 c. c. de sérum à des grenouilles pesant de 18 à 25 grammes; l'injection avait lieu sous la peau de la cuisse ou du genou, et quelquefois dans l'épaisseur des muscles de la cuisse. Le résultat était le même dans les deux cas.

Nous devons faire remarquer que nos deux expériences ont porté sur deux espèces : la *Rana temporaria* et la *Rana esculenta*, car les deux espèces nous fournissaient les nerfs pour l'émulsion. Les exemplaires de *Rana temporaria* ayant été conservés dans des bocaux pendant tout un hiver étaient fortement épuisés et se sont montrés beaucoup plus sensibles à l'action du sérum. La dose d'un centimètre cube était presque toujours mortelle pour elles, tandis que pour *Rana esculenta*, il fallait une dose double pour obtenir le même résultat. De même les altérations observées dans les mouvements étaient marquées chez les *Rana temporaria* d'une façon beaucoup plus nette, en raison des particularités de la constitution anatomique de cette espèce.

Pour observer les phénomènes consécutifs à l'injection, nous faisons sortir les grenouilles des bocaux où elles se trouvaient et nous les mettions sur une table ou par terre.

Passons à la description des phénomènes observés. Une à 3 heures environ après l'injection du sérum préparé, on peut déjà constater une différence entre les mouvements de la grenouille soumise à l'expérience et ceux de l'animal de contrôle ayant reçu une dose égale, et même supérieure, du sérum de cobaye normal. Tandis que cette dernière grenouille ne se distingue en rien d'un animal normal, la première perd de sa vivacité, remue peu, reste au repos, contrairement à ce qui a lieu normalement pour ces animaux, que leurs mouvements emportent sans cesse au delà de l'espace qu'on leur assigne. Si l'on touche la grenouille soumise à l'expérience, dans le but de provoquer des mouvements, ses premiers sauts n'offrent rien de particulier, mais bientôt une différence notable s'établit entre eux et les mouvements de la grenouille de contrôle. L'animal se fatigue rapidement, les sauts deviennent d'une étendue toujours moindre, irréguliers, ataxiques. Si on la laisse se reposer pendant quelque temps, elle recommence à sauter un peu mieux, quoique moins bien que la grenouille de contrôle. Un peu plus tard (2 à 6 heures après l'injection) ce phénomène devient encore plus marqué. Dès les premiers mouvements, l'animal soumis à l'expérience se comporte maintenant différemment de l'animal de contrôle. En sautant, il se soulève un peu au-dessus de la surface sur laquelle il se meut, les mouvements sont lents, gênés, irréguliers. Si on l'excite à se mouvoir après quelques mouvements, des phénomènes de paralysie s'observent : l'animal traîne l'une ou l'autre de ses pattes postérieures ou les deux à la fois. Après un temps de repos, les mouvements deviennent légèrement meilleurs. Les grenouilles restent dans cet état pendant des heures. Parmi celles que nous avons étudiées, un certain nombre sont mortes sans présenter d'autres phénomènes.

Chez d'autres individus (chez *Rana temporaria* principalement), les phénomènes de paralysie allaient beaucoup plus loin. L'animal perdait totalement l'usage, d'abord d'un de ses membres postérieurs qu'il traînait comme un objet inerte, puis de l'autre ; il ne pouvait guère se mouvoir alors qu'à l'aide des

pattes antérieures, en trainant le tronc et les pattes postérieures qui suivaient le mouvement. Ensuite, les mouvements des membres antérieurs deviennent, à leur tour, plus lents; ils sont, eux aussi, frappés de paralysie, et bientôt la mort survient. Les phénomènes observés ressemblent de près à ceux qui, dans la pathologie humaine, portent le nom de paralysie de Landry,

La plupart des grenouilles sont mortes 12 à 48 heures après l'injection; 2 seulement ont vécu pendant 3 jours. Seize grenouilles ont ainsi reçu du sérum de cobayes préparés. Tous les animaux offraient, après l'injection, des altérations de la fonction locomotrice; les phénomènes étaient plus ou moins marqués suivant la dose employée. Il faut faire remarquer encore que chez les uns c'étaient les phénomènes d'ataxie qui étaient le plus prononcés, chez les autres des phénomènes de paralysie. Celles à qui on injectait une dose non mortelle ($1/2$ gramme pour la *Rana temporaria*, 1 gramme pour la *Rana esculenta*) ne présentaient jamais une paralysie complète, mais seulement un affaiblissement des mouvements, affaiblissement qui, d'ailleurs, disparaissait au bout de quelque temps sans laisser aucune trace.

Des grenouilles de contrôle auxquelles on injectait des doses égales, et même supérieures, du sérum pris à des cobayes normaux, aucune n'est morte.

Pour vérifier si nos grenouilles ne mouraient pas d'une infection, nous avons pris sur plusieurs d'entre elles, et d'une façon aseptique, du sang du cœur, et nous l'avons transporté dans des milieux de culture. Les résultats étaient toujours négatifs, aucun développement n'avait lieu.

Le sérum obtenu par nous présentait encore une autre propriété mélangé à l'émulsion des nerfs de grenouille. il produisait une agglutination, visible aussi bien dans des tubes à essai que sous le microscope.

Nous avons examiné les nerfs périphériques des membres antérieurs et postérieurs chez les grenouilles mortes à la suite de l'injection du sérum des cobayes préparés. Dans quelques cas, nous avons également examiné les nerfs du tronc. Nous nous sommes servi surtout de l'acide osmique à $1/2$ à $10/0$ (méthode de Marquis) et, pour l'étude du cylindraxe et des noyaux de la gaine de Schwann, du bleu de méthylène (méthode

de Rossolimo et Mouravieff ¹⁾ et de l'hématoxyline. Nous avons fait aussi des coupes longitudinales et transversales dans toute l'étendue de la cuisse elle-même, à l'effet de voir la réaction qui se manifesterait après l'injection dans les vaisseaux, réaction qui, on le voit, est toujours très marquée à la suite d'injection d'autres cytotoxines (Nefedieff ²⁾, Pironet ³⁾, Armand Delisle ⁴⁾).

Nous avons également examiné le cerveau et la moelle épinière, pour étudier l'état des cellules nerveuses à la suite de nos expériences.

Voici les résultats des études faites sous le microscope : Les grenouilles qui n'ont pas vécu plus de 24 heures après l'injection présentent uniquement une hyperémie des vaisseaux dans le voisinage des faisceaux nerveux. L'hyperémie des petits vaisseaux est très nette : elle s'accompagne de diapédèse des leucocytes ; quelquefois on la constate même à l'œil nu ; dans d'autres cas, il faut avoir recours au microscope. La gaine de myéline n'offre aucune modification, ou bien des modifications insignifiantes. Chez les animaux ayant vécu 1 jour et demi, 2 jours et plus, on constate toujours, à côté de l'hyperémie, des altérations de la gaine de myéline, altérations d'autant plus marquées que la durée de la vie se prolonge davantage. On peut suivre tous les changements produits dans la gaine de myéline, depuis sa fragmentation en gros segments, séparés par de petits intervalles, jusqu'au degré extrême d'altération où la gaine de myéline tout entière se divise en une série de petites granulations avec, entre elles, des intervalles considérables ne se colorant pas par l'acide osmique. Les altérations subies par la gaine de myéline, après l'injection du sérum, sont plus importantes que celles constatées par nous chez les grenouilles à la suite d'une section complète des nerfs. 3 ou 4 jours après l'opération. A côté des altérations de la gaine de myéline, nous avons vu également la multiplication des noyaux de la gaine de Schwann et la fragmentation en segments du cylindraxe.

Ces modifications avaient lieu non seulement dans les nerfs

1. *Neurolog. Centralblatt*, 1897, 16.

2. *Annales de l'Inst. Pasteur*, 1901.

3. *Archives des sciences biologiques*, 1903.

4. *C. R. des séances de la Soc. de Biologie*, 1904. Séance du 10 décembre.

sciatiques— ceux qui nous servaient pour l'émulsion— mais également dans les nerfs des membres antérieurs et dans ceux du tronc.

L'étude du cerveau et de la moelle épinière n'a montré aucune altération des cellules nerveuses.

Il faut noter qu'en dehors de ses propriétés neurotoxiques, notre sérum présentait à un haut degré des propriétés hémolytiques vis-à-vis des hématies de la grenouille. Pour nous assurer que les phénomènes décrits plus haut ne sont pas le résultat des propriétés hémolitiques de notre sérum, nous avons, en injectant du sang défibriné de grenouille à des cobayes, obtenu un sérum fortement hémolytique, et nous l'avons essayé. Jamais nous n'avons observé de phénomènes semblables à ceux qui suivent l'injection du sérum neurotoxique. En injectant en même quantité un sérum ayant un pouvoir hémolytique égal à celui du sérum neurotoxique, ou même un pouvoir supérieur, nous n'avons pu obtenir aucun phénomène morbide, exactement comme si nous avions injecté du sérum de cobaye normal. Le sérum hémolytique, aussi bien fort que faible, ne produisait aucune action sur les nerfs.

Les phénomènes décrits plus haut ne peuvent donc aucunement être attribués aux propriétés hémolytiques si faibles que présente le sérum obtenu par nous.

Après avoir injecté dans la cavité péritonéale des cobayes l'émulsion des nerfs périphériques, nous avons voulu suivre le sort ultérieur de cette émulsion. La myéline, avec sa réaction caractéristique sous l'influence de l'acide osmique, était très commode pour cette étude.

Quelques heures après l'injection, nous avons pu voir dans l'exsudat péritonéal un grand nombre de leucocytes ayant englobé de petites particules de myéline; cependant, ces particules se trouvaient aussi en grand nombre, libres dans le liquide péritonéal.

Vingt-quatre heures après, ces particules libres étaient déjà peu nombreuses; la plupart ont été englobées par les leucocytes.

Nous examinâmes ensuite la rate et le foie des cobayes étudiés, ainsi que le caillot de sang qui restait après l'obtention du sérum. Les méthodes employées étaient principalement celles de Marquis et B.¹

1. *Neurolog. Centralbl.*, 1898, p. 476.

Les coupes du foie et de la rate, comme celles du caillot sanguin, nous ont montré des leucocytes ayant englobé un grand nombre de particules de myéline. C'est dans le caillot sanguin que le phénomène est le plus net, car les globules blancs en constituent presque uniquement la couche superficielle. Nous n'avons jamais pu constater de particules de myéline dans d'autres éléments, pas plus que nous n'avons pu les voir à l'état libre dans les organes (foie et rate).

Elles se trouvaient toujours à l'intérieur des leucocytes. Il était difficile de déterminer plus exactement la nature de ces derniers, car ils étaient, le plus souvent, entièrement bourrés de granulations de myéline colorées en noir par l'acide osmique. Ces observations montrent une fois de plus que les leucocytes sont bien le laboratoire mystérieux dans lequel s'élaborent, par des processus compliqués, les substances qui donnent au sérum de l'animal préparé ses propriétés nouvelles.

Les conclusions que nous pouvons formuler à la suite de notre travail sont les suivantes :

1. L'introduction répétée de l'émulsion des nerfs périphériques de la grenouille dans la cavité péritonéale des cobayes fait naître, dans le sérum de ces derniers, des substances exerçant une action destructive sur les nerfs périphériques de la grenouille.

2. Cette action se manifeste, après l'injection, sous la peau de la grenouille, du sérum des cobayes préparés, par des modifications aussi bien physiologiques — troubles de locomotion, — qu'anatomiques — altérations très marquées de la gaine de myéline, multiplication des noyaux de la gaine de Schwann, fragmentation du cylindraxe en segments.

3. Le sérum étudié présente, en plus de ces propriétés, celle de fournir la réaction de l'agglutination lorsqu'on le mélange à l'émulsion des nerfs périphériques de la grenouille.

4. A côté de ses propriétés neurotoxiques, ce sérum possède un faible pouvoir hémolytique. Un sérum hémolytique, de même force ou même de force supérieure à celui obtenu par nous, ne provoque aucun phénomène pathologique lorsqu'il est injecté sous la peau à la même dose.

5. Quelque temps après l'injection de l'émulsion des nerfs périphériques dans la cavité péritonéale du cobaye, on ne trouve

plus de particules de myéline à l'état libre : elles sont toutes englobées par les leucocytes.

En terminant mon travail, je crois remplir un devoir agréable en exprimant ma profonde reconnaissance au professeur E. Metchnikoff qui a bien voulu m'autoriser à travailler dans son service et pour ses conseils.

J'adresse également mes remerciements au docteur A. Besredka pour les conseils et les indications qu'il m'a donnés au cours de mon travail.

Le Gérant : G. MASSON.

Seoaux. — Imprimerie Charaire.

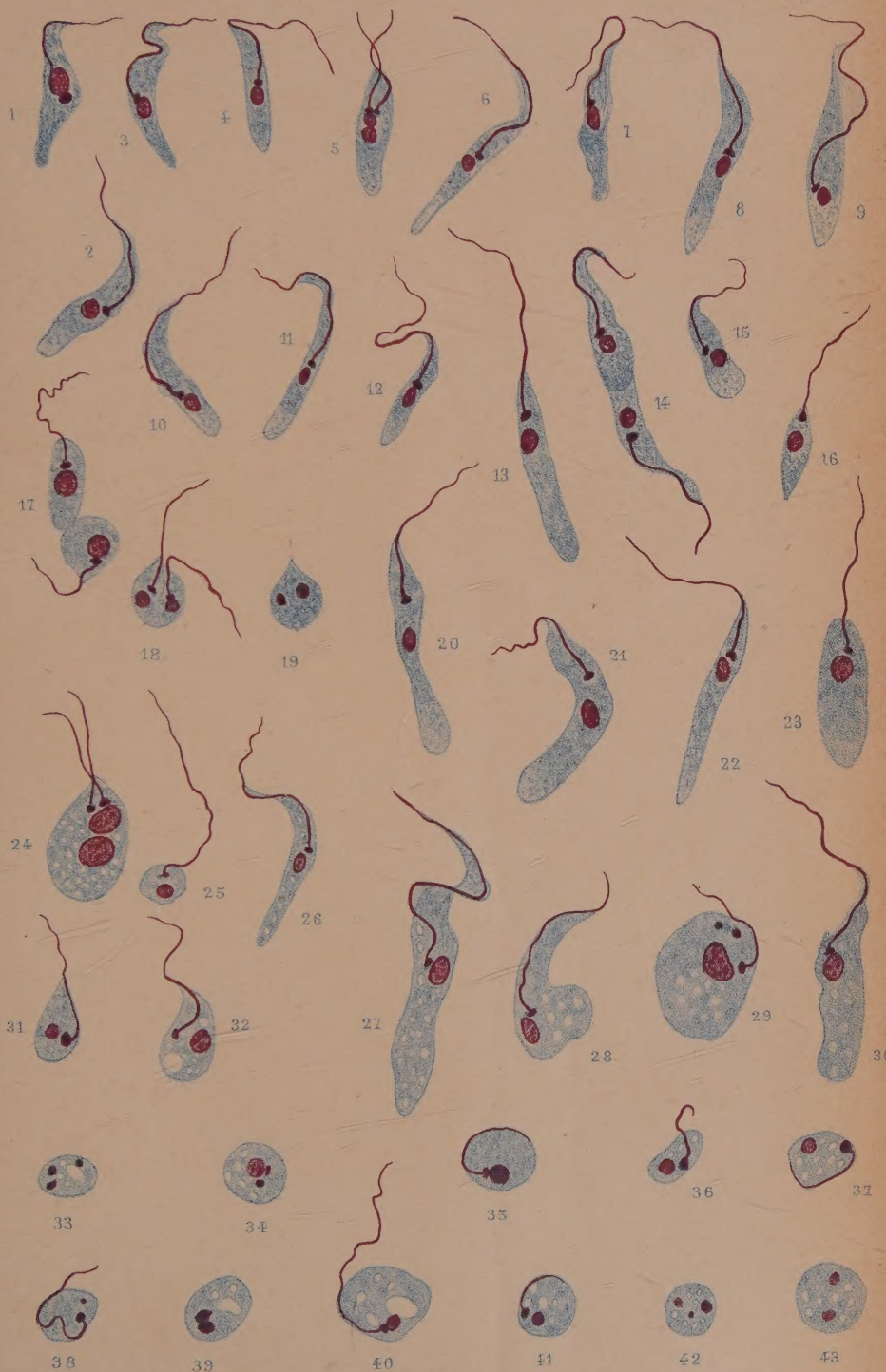


Fig. I



Fig. II

